

**Die Induktion der Cytochrom P4501A1-mRNA in  
Präzisionsleberschnitten der Ratte nach Einwirkung von  
β-Naphthoflavon (in vitro)**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Andreas Lößner

geboren am 25.11.1973 in Magdeburg.

Gutachter 1: \_\_\_\_\_

Gutachter 2: \_\_\_\_\_

Gutachter 3: \_\_\_\_\_

Tag der öffentlichen Verteidigung: \_\_\_\_\_

## INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	6
1.1. Die Biotransformation	6
1.2. Das Cytochrom P450	8
1.3. Die Induktion des Cytochrom P450	12
1.4. Die Notwendigkeit eines Induktionsnachweises und die Bedeutung von Präzisionsleberschnitten	16
2. ZIELSTELLUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Gewinnung des Probenmaterials aus Versuchstieren	20
3.1.1. Versuchstiere	20
3.1.2. Gewebegewinnung	20
3.1.3. Materialgewinnung	22
3.2. Bestimmungsmethoden	23
3.2.1. Gewinnung und Reinigen der Gesamt-RNA aus Lebergewebe	23
3.2.2. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der aus Lebergewebe isolierten Gesamt-RNA	24
3.2.3. Die reverse Transkription (RT)	26
3.2.4. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
3.2.5. Die Gelelektrophorese	32
3.2.6. Dokumentation der Elektropherogramme	34
3.2.7. Die kompetitive RT-PCR	35
3.3. Methodische Voruntersuchungen zur Bestimmung von CYP1A1- mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon Exposition	38
3.3.1. Gewinnung der Gesamt-RNA	38
3.3.2. RT-PCR	39
3.3.3. Dokumentation und Auswertung	41

4. ERGEBNISSE	45
4.1. Die Optimierung der RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in Leberpräzisionsschnitten als Induktionsnachweis	45
4.1.1. Magnesiumchlorid-Konzentration	45
4.1.2. Template-Konzentration	48
4.1.3. Primer-Konzentration	51
4.1.4. Zyklenzahl zur Vervielfältigung der CYP1A1-mRNA	53
4.1.5. Ölbeschichtung und Heizdeckel	56
4.2. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach verschiedenen Vorbehandlungen	58
4.2.1. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten ohne $\beta$ -Naphthoflavon-Einwirkung	58
4.2.2. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition	60
4.2.2.1. Analyse der CYP1A1-mRNA aus Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Behandlung mit der kompetitiven RT-PCR	60
4.2.2.2. Analyse mit dem Video-Dokumenations-System	64
4.2.3. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition sowie nach In-vivo-Vorbehandlung mit $\beta$ -Naphthoflavon	67
5. DISKUSSION	69
6. ZUSAMMENFASSUNG	78
7. LITERATUR	82
8. ANHANG	93

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Die Biotransformation

Jeder Organismus nimmt ständig eine Vielzahl von Substanzen (Nährstoffe, Vitamine, Spurenelemente, Arzneimittel, Schadstoffe usw.) auf. Die Auseinandersetzung mit diesen lebenswichtigen, aber auch toxischen Stoffen ist eine für das Leben fundamentale Frage.

So wie die meisten aufgenommenen Stoffe unterliegen auch Xenobiotica (Fremdstoffe) im Organismus nach ihrer Aufnahme einer Verteilung und Elimination, worunter alle Prozesse zusammengefaßt werden, die zur Konzentrationsabnahme des Stoffes im Organismus führen. Die Elimination umfaßt die enzymatische Umwandlung des Wirkstoffes in seine Metabolite und deren Ausscheidung (Exkretion). Ein sehr wesentlicher Prozeß dabei ist die Biotransformation. Durch die Reaktionen der Biotransformation werden lipidlösliche Fremdstoffe in wasserlösliche überführt. Die Wasserlöslichkeit bzw. Hydrophilie ist eine grundlegende Voraussetzung für die Ausscheidung einer Substanz über die Niere und/oder die Leber (Funae et al., 1985; Aström und DePierre, 1986; Bast, 1996).

Das zentrale Organ der Biotransformation ist die Leber. Die Lunge, Niere und Dünndarmschleimhaut spielen bei den enzymatischen Reaktionen der Biotransformation eine untergeordnete Rolle.

Der Fremdstoffmetabolismus verläuft üblicherweise in zwei Phasen (Blauboer, 1996; Fichtl et al., 1996):

*Phase I- oder Funktionalisierungsreaktionen:* Die Ausgangsverbindungen werden oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Die Reaktionen der Phase I können zu einem Wirkungsverlust oder zu einer Wirkungsverstärkung führen (metabolische Aktivierung), was z.B. bei bestimmten Medikamenten, sogenannten Prodrugs, eine wichtige Rolle spielt (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1: Einfluß der Biotransformation auf die Wirkung von Stoffen.

*Wirksamkeitsminderung:*

Barbiturate	→	Hydroxybarbiturate
-------------	---	--------------------

*Fehlender Einfluß:*

Methylphenobarbital	→	Phenobarbital
---------------------	---	---------------

*Metabolische Aktivierung (Giftung):*

Parathion	→	Paraoxon
-----------	---	----------

*Phase II- oder Konjugationsreaktionen:* Die durch die Phase-I-Reaktionen entstandenen sogenannten Intermediärprodukte werden konjugiert. Durch Kopplung an Reste der Glukuron-, Schwefel-, Carbon- und Aminosäuren sowie des Glutathion entstehen häufig inaktive und wasserlösliche Produkte. Die Phase-II-Reaktionen der Biotransformation führen überwiegend zu einer Entgiftung.

Die in Tabelle 1-1 gezeigten Beispielen machen deutlich, daß die Wirksamkeit vieler Xenobiotica durch die Mechanismen der Biotransformation und deren Veränderbarkeit erheblich beeinflußt werden kann. Dies kann beispielsweise in der Langzeit-Arzneimitteltherapie am Patienten von praktischer Relevanz sein.

## 1.2. Das Cytochrom P450

Das CYP ist ein Enzymsystem, das 1958 von Klingenberg und Garfinkel entdeckt wurde. Es ist in der Biotransformation von zentraler Bedeutung (Blauboer, 1996; Fichtl et al., 1996). Das CYP bewirkt vor allem die zu den Phase-I-Reaktionen gehörende Monooxygenierung von Fremdstoffen.

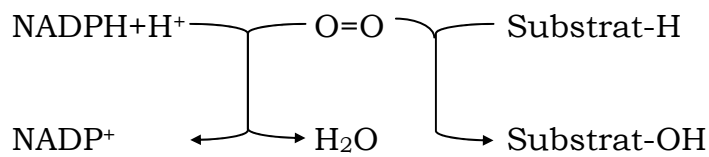
Es katalysiert im Organismus neben dem Abbau von Fremdstoffen auch die Biosynthese von Prostaglandinen, Steroiden und Leukotrienen. Außerdem spielt es eine Rolle beim Geruchssinn (Ehling et al., 1990; Fichtl et al., 1996). Wegen seines Absorptionsmaximums nach Bindung von CO an das zweiwertige Eisen bei 450 nm erfolgte seine Bezeichnung als Cytochrom P450. Das Enzymsystem wurde außer beim Menschen auch in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien nachgewiesen, wo es zahlreiche Substrate umzusetzen vermag (Black et al., 1987; Porter et al., 1991). Grundlage für seine Substratvielfalt ist die strukturelle Flexibilität, die durch komplexe Interaktionen des Enzymsystems mit Substraten, Lipiden oder Redox-Proteinen bedingt ist (Black et al., 1985; Hoa et al., 1989).

Das CYP der Säuger ist in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Mitochondrien lokalisiert, wo es in Kontakt mit der CYP-Reduktase steht. Als Micell-Aggregat besitzt es amphiphilen Charakter (Dean et al., 1982).

Die Reaktion des CYP ist charakterisiert durch die Übertragung eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff auf das Substrat. Dadurch wird dieses oxidiert (Monooxygenasesystem). Das zweite Sauerstoffatom wird durch das CYP zu Wasser reduziert. Deshalb wird das CYP auch als mischfunktionelle Oxygenase bezeichnet (Mason, 1957).

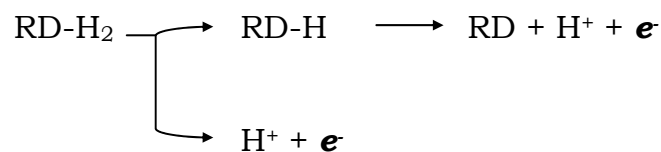
Die Summenreaktion des CYP ist zusammenfassend in Abbildung 1-1 dargestellt.

Abbildung 1-1: Summenreaktion der CYP-katalysierten Reaktionen.



In den Reaktionen des CYP kommt der CYP-Reduktase eine große Bedeutung zu, die zweimal je ein Elektron bereitstellt (Abbildung 1-2).

Abbildung 1-2: Elektronenbereitstellung (e-) durch die CYP-Reduktase (RD) in zwei Reaktionsschritten.



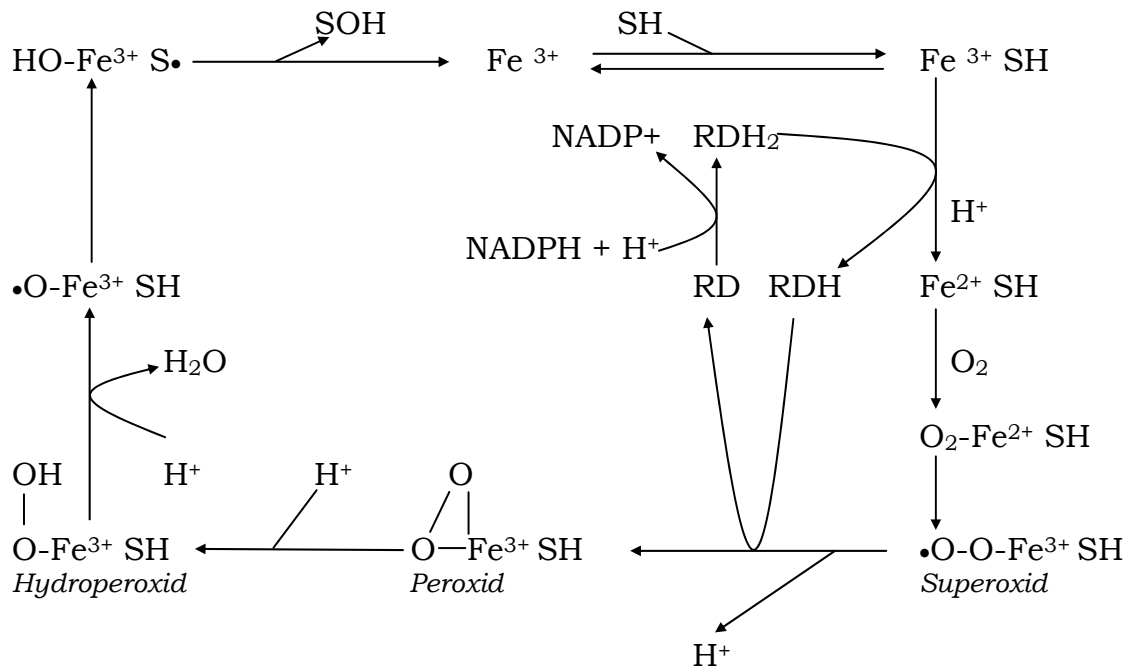
Die CYP-vermittelte Oxidation ist ein komplexer Kreisprozeß, bei dem kurzlebige Zwischenprodukte (Radikale) entstehen können. Diese können mitunter charakteristische Folgereaktionen bedingen (Fichtl et al., 1996). Der Ablauf dieses Prozesses ist in Abbildung 1-3 schematisch dargestellt.

Die Bestimmung der Primärstrukturen (Aminosäuresequenzen) des CYP unterliegt einem ständigen Progreß. Im Jahr 1992 ging man von 160 verschiedenen, in der Zusammensetzung vollständig untersuchten CYP-Primärstrukturen aus (Black et al., 1992).

Jede CYP-Kette besitzt einen N-Terminus mit einer stark hydrophoben sogenannten Signal-Anker-Sequenz, der eine kurze kationische Sequenz (englisch als „halt transfer“ bezeichnet) und eine Prolingruppe folgen.



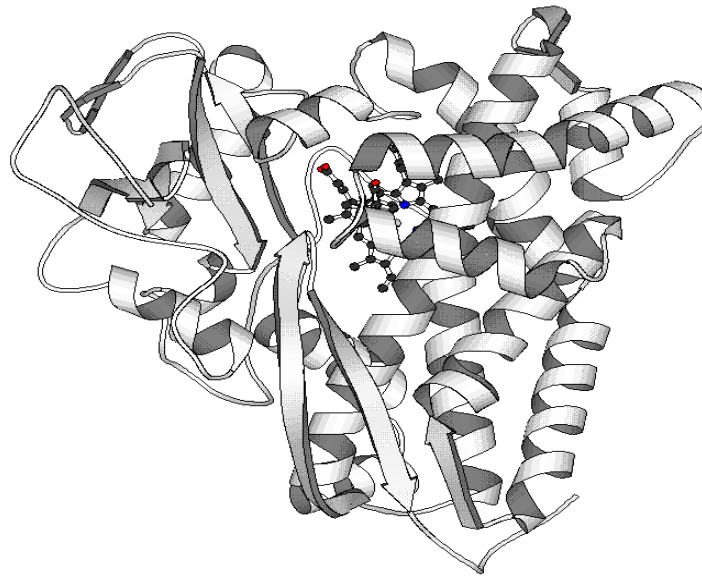
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung einer Oxidationsreaktion durch das CYP (nach Ruckpaul, 1993; Fichtl et al., 1996).



Der stark hydrophobe N-Terminus ist der Teil des Enzyms, der in die Membranen gebunden ist (Black et al., 1992). Über einen N-Terminus verfügen bei den mitochondrialen CYP nur die im Zytosol gebildeten Vorstufen, nicht jedoch die „reifen“ membranständigen Formen. Der wesentlich größere Teil der Monooxygenase ist dem Zellinneren zugewandt. Das CYP enthält pro Polypeptid eine über Cystein gebundene Häm-Gruppe (Schenkman et al., 1993).

Die Sekundärstrukturen des CYP liegen in Form von  $\alpha$ -und  $\beta$ -Helices vor. Die Tertiärstruktur der eukaryontischen CYP ist bislang noch nicht vollständig bekannt. Man nimmt jedoch an, daß das CYP eines Bakteriums (*Pseudomonas putida*: CYP 101 bzw. CYP<sub>cam</sub>) als artspezifisches Modell für den zytosolischen Teil des Eukaryonten-CYP angesehen werden kann (Abbildung 1-4).

Abbildung 1-4: Kristallstruktur der CYPcam. CYP eines Bakteriums (*Pseudomonas putida*), das als artspezifisches Modell für den zytosolischen Teil des Eukaryonten-CYP gesehen werden kann.



2CPP

Spiralen:  $\alpha$ -Helices, Pfeile:  $\beta$ -Faltblattstrukturen,  
dazwischen  $\beta$ -Schleifen und andere Spiralen.

Ähnlich wie bei anderen Enzymen, z.B. der Lactatdehydrogenase haben sich auch beim CYP im Laufe der Evolution durch Gen-Duplikation und Mutation zahlreiche Isoenzyme entwickelt. Diese multiplen Formen katalysieren die gleichen Reaktionen, jedoch mit unterschiedlicher Substratspezifität.

Die Isoenzyme des CYP werden in der sogenannten CYP-Gen-Superfamilie zusammengefaßt. Die CYP-Superfamilie besteht aus Familien und Subfamilien. Eine Übereinstimmung der Primärstruktur von weniger als 40% bedeutet, daß es sich um unterschiedliche Familien handelt. Stimmen die Aminosäuresequenzen in 40% bis 55% überein, bedeutet dies, daß es sich um gleiche Familien, jedoch um unterschiedliche

Subfamilien handelt. Stimmt die Primärstruktur in über 55% überein, so gehören die Isoenzyme zu einer Subfamilie (Forth, 1996). Bisher kennt man 74 solcher CYP-Gen-Familien. Die 14 bei Säugetieren vorkommenden Familien umfassen 26 zur Zeit bekannte Subfamilien.

Diese Einteilung ist die Grundlage für die Nomenklatur des Enzyms. CYP oder Cyp (bei der Maus und Drosophila) steht dabei für Cytochrom P450. Diesem folgt eine arabische Ziffer der Familie, der Großbuchstabe der Subfamilie und eine zweite arabische Nummer, die das einzelne individuelle Gen in der Subfamilie repräsentiert, z.B. CYP1A1 (Nelson et al., 1996).

### **1.3. Die Induktion des Cytochrom P450**

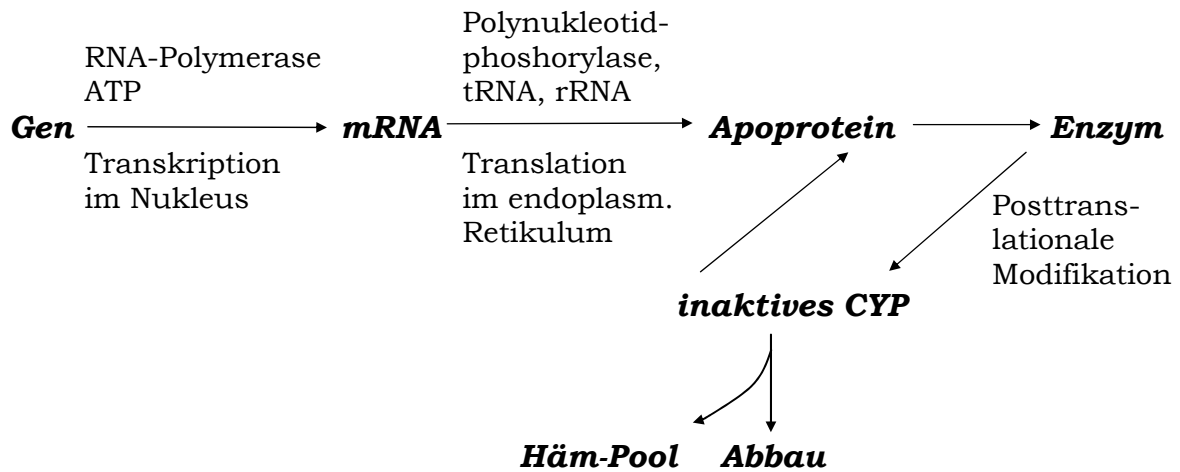
Wegen der Schlüsselfunktion des CYP bei der Biotransformation von Fremdstoffen sind Mechanismen, die einen Einfluß auf die katalytische Aktivität dieses Enzymsystems haben, von sehr großer Bedeutung.

Eine exponierte Stellung nimmt hierbei die Induktion ein. So führt eine Vielzahl von Wirkstoffen über eine Aktivierung der Genexpression zu einer vermehrte Bildung von Enzymmolekülen und zu einer Aktivitätssteigerung dieses Enzymsystems.

Das CYP und seine Isoenzyme sind sowohl in vivo als auch in vitro induzierbar. So konnte z.B. CYP1A1 in vivo in der Leber, in der Haut, Niere oder Lunge aber auch in vitro in bestimmten Zelllinien (z.B. Hepa-1, H4IIEC3, MCF-7) sowie in Primärkulturen von Hepatozyten induziert werden (Whitlock et al., 1986; Gotoh et al., 1989).

Den Ablauf der Biosynthese des CYP zeigt Abbildung 1-5 (Gibson et al., 1994). Häufig entscheidet die Struktur des Induktors, auf welchen der dargestellten Schritte der Genexpression ein Einfluß ausgeübt wird (Waxman et al., 1992).

Abbildung 1-5: Ablauf der Biosynthese des CYP (Lewis et al. 1995).



Eukaryontische Gene bestehen aus codierenden und nicht codierenden Abschnitten, Exons bzw. Introns. Die Organisation der CYP-Gene und deren Exon-Intron-Struktur sind bereits untersucht worden (Omura et al., 1993). Das CYP1A1-Gen der Ratte besteht aus 7 Exons, 6 Introns, hat eine Größe von 5984 bp und ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert. Auch einige andere CYP-Gene gruppieren sich speziesabhängig an spezifischen Orten bestimmter Chromosomen, was eine koordinierte Regulation ermöglicht (Pearce et al., 1992; Kemper et al., 1993).

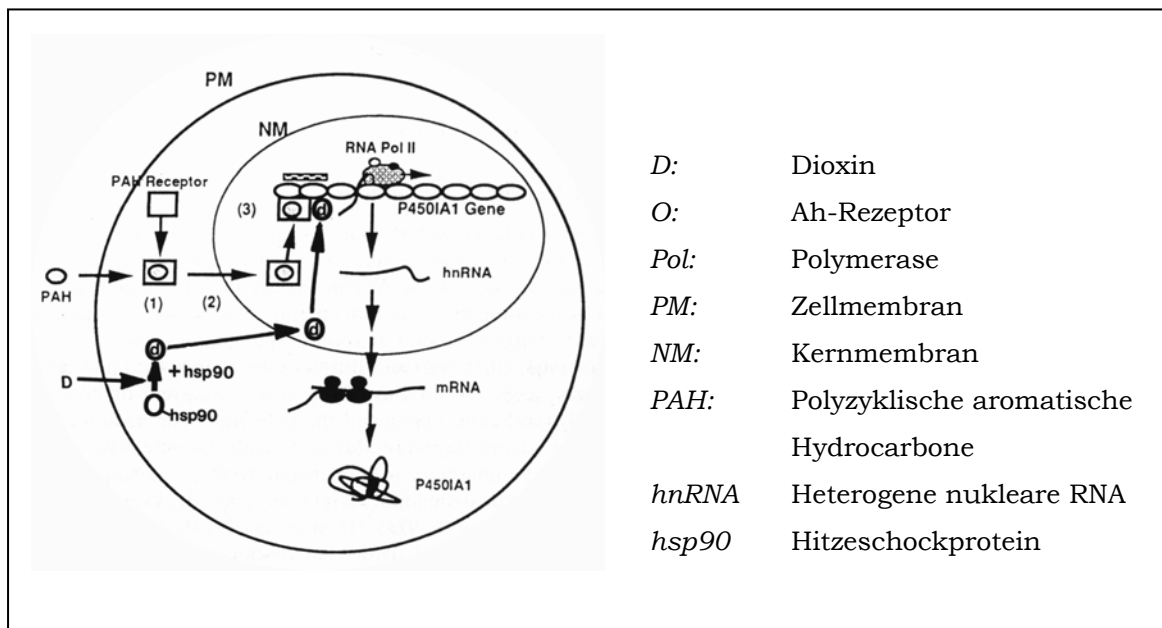
Die Gene enthalten Regulationsregionen, mit denen der Induktor interagieren kann. Diese Interaktion ist ein Kettenmechanismus (Abb. 1-6). Er beginnt mit der Bindung des Induktors an ein intrazelluläres, lösliches Rezeptorprotein, dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, der auch als Ah-, TCDD- oder Dioxin-Rezeptor bezeichnet wird (Whitlock et al., 1986; Gotoh et al., 1989). Dieser Rezeptor besitzt viele gemeinsame Eigenschaften mit den Glucocorticoid-Rezeptoren (Denis et al., 1988; Perdew et al., 1988).

Anschließend folgt die Dissoziation des Ah-Rezeptor-Komplexes und Abspaltung des Hitze-Schock-Proteins (HSP 90). Damit wird die Bindung des sogenannten Ah-Rezeptor-Nukleus-Translokationsfaktors (Arnt)

möglich, der die Verlagerung des Rezeptorkomplexes in den Kern erleichtert (Hankinson et al., 1995).

Dieser Komplex interagiert mit Regulationselementen, die sich in den Regulationsregionen des CYP1A1-Gens befinden (sogenannte „Cis-Acting-Elements“ und „Trans-Acting-Factors“).

Abbildung 1-6: Mechanismus der CYP1A1-Induktion (Schenkman et al., 1993)



Wenn auch die Regulationsmechanismen bisher nicht vollständig verstanden sind, wird davon ausgegangen, daß die Induktoren mit spezifischen Regulationselementen direkt interagieren (Omura et al., 1993; Hines et al., 1994). So können Xenobiotica, Östrogene oder Glukokortikoide über ihre eigenen Regulationselemente eine Induktion des CYP hervorrufen (Kemper et al., 1993).

Die Struktur und die Anordnung der Regulationselemente können auf das Induktionsniveau hinweisen (Fujisawa-Sehara et al., 1987; Wen et al., 1990; Yaniagina et al., 1990). Die Zusammensetzung der Elemente der Regulationsregion ist vor allem abhängig von Spezies, Alter, Geschlecht,

Entwicklungsstand, Zelltyp und Familien- bzw. Subfamilienzugehörigkeit (Horbach et al., 1992; Hines et al., 1994).

Trotz der erwähnten Spezifität der Regulationselemente ist es ihre große Vielfalt, die erklärt, daß ein Isoenzym durch verschiedene Substanzen induziert werden kann. Dies gilt auch für die CYP1A-Familie (siehe Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2: Beispiele für Induktoren der CYP1A-Subfamilie (Okey et al., 1990; Gibson et al., 1993; Liu et al., 1993). Gebunden an den Ah-Rezeptor werden sie in den Zellkern transportiert und können mit ihren spezifischen Regulationselementen interagieren.

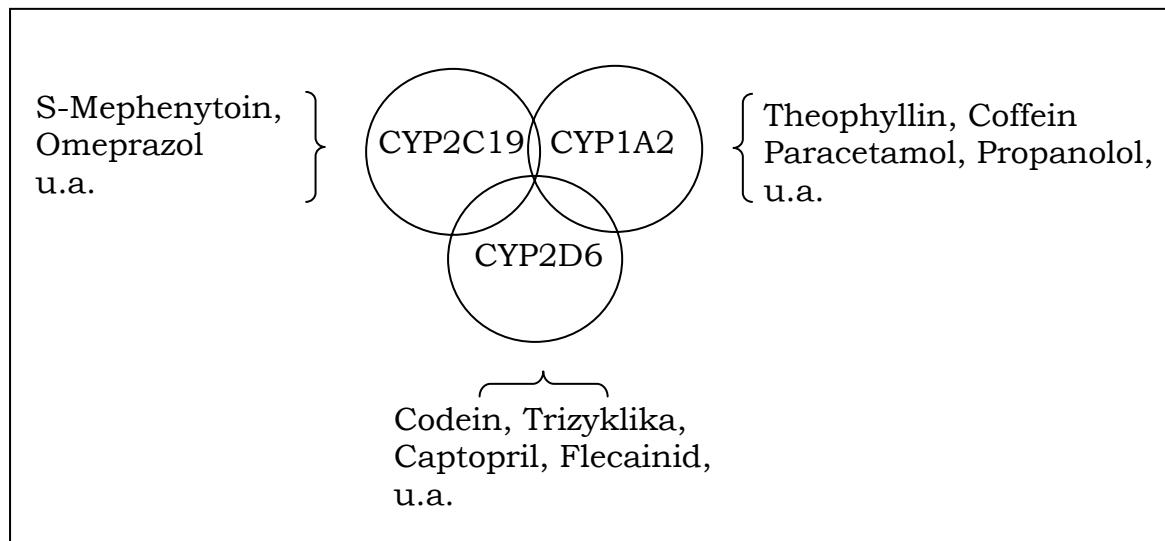
- |  |                        |
|--|------------------------|
| • Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe | • Indolocarbazole      |
| • $\beta$ -Naphthoflavon (und andere Flavone)  | • Phenothiazine        |
| • Pflanzliche Indole (z.B. Indol-3-Carbinol)   | • 2-Acetylaminofluoren |
| • TCDD (u.a. halogenierte Dibenzo-p-Dioxine)   | • Zigarettenrauch      |
| • Halogenierte Dibenzofurane                   | • Petroleum (roh)      |
| • Polychlorierte Biphenyle (PCB)               | • Coumarine            |
| • Polybromierte Biphenyle (PBB)                |                        |
- 

Die CYP1A1-Induktion verbunden mit einer Modulation der Genexpression auf der Transkriptionsebene ist für den Induktionsnachweis von enormer Relevanz (Fujisawa-Sehara et al., 1988; Denison et al., 1988; Saatcioglu et al., 1990). Die Transkriptionsverstärkung führt zur Steigerung der CYP1A1-mRNA (Potenza et al., 1989), was einen Induktionsnachweis mittels RT und PCR ermöglicht.

#### 1.4. Die Notwendigkeit eines Induktionsnachweises und die Bedeutung von Präzisionsleberschnitten

Aufgrund der zentralen Rolle des CYP im Stoffwechsel vieler Substanzen ist das Interesse an diesem Enzym beispielsweise in der Arzneimittelforschung verständlich. Auch bei der medikamentösen Therapie am Patienten können die Interaktionen gleichzeitig gegebener Substanzen von enormer Relevanz bezüglich veränderten Dosis-Wirkungs-Beziehungen sein. Eigentlich zur Heilung bestimmte Medikamente können wegen der Enzyminduktion unwirksam oder aber zu „Giften“ werden. Die Abbildung 1-7 gibt einen Überblick über einige typische Wirkstoffe und deren Wechselwirkung mit dem CYP-System.

Abbildung 1-7: Überblick über einige typische Wirkstoffe und deren Wechselwirkung mit Enzymen des CYP-Systemes.



Präzisionsleberschnitte in moderner Herstellung sind gegenwärtig ein zunehmend anerkanntes Modell zur In-vitro-Untersuchung der Metabolisierung von Xenobiotica. Andere In-vitro-Modelle, wie Zellkulturen, zeigen häufig Zeichen der Entdifferenzierung oder gar den Verlust an CYP. Demgegenüber sind die Präzisionsleberschnitte durch eine ausreichende Überlebenszeit zum Induktionsnachweis sowie durch eine simple Herstellung gekennzeichnet (Müller et al., 1998).

Die Verwendung von Organschnitten begann 1923 durch Warburg. Wegen der nur unzureichenden Reproduzierbarkeit bei der Herstellung solcher Schnitte, traten die Gewebeschnitte in ihrer Bedeutung als In-vitro-Modell zunächst in den Hintergrund. Außerdem standen Hepatozyten, die man seit den sechziger Jahren aus Rattenlebern zu isolieren vermag, als Modell für pharmakologische und toxikologische Untersuchungen in Konkurrenz mit den Leberschnitten (Berry et al., 1969).

Erst mit der technischen Entwicklung präziser arbeitender Schnittgeräte durch Krumdieck (Krumdieck et al., 1980) wuchs die Bedeutung von Gewebeschnitten für In-vitro-Untersuchungen. Der „Krumdieck-Slicer“ ermöglicht die reproduzierbare Herstellung 0,2 bis 0,25 mm dünner Schnitte, was für eine ausreichende, gleichmäßige Oxygenierung und Substratversorgung der Gewebeproben notwendig ist, gerade dann, wenn die Behandlung mit schwach induzierenden oder gering-konzentrierten Substanzen erfolgt. Die geringe Verletzung der Gewebe war zudem vorteilhaft (Müller et al., 1998).

Zahlreiche Übersichtsarbeiten informieren inzwischen über die Verwendung von LS und ihre Bedeutung als In-vitro-Modell (Barr et al., 1991; Fisher et al., 1991; Miller et al., 1993; Saylers et al., 1994).

Bei Untersuchungen von Stoffwechselmetabolismen sind die LS inzwischen von größerer Bedeutung als die Hepatozyten, da sie In-vivo-Bedingungen näher kommen (Fisher et al., 1991; Wright et al. 1992; Parrish et al., 1995; Ekins et al., 1996b; Olinga et al., 1997b).

Es ist ein ständiges Bestreben, LS genauer beschreiben zu können. Müller et al. untersuchen daher seit vielen Jahren neben unspezifischen



Parametern (Kalium-, Gluthation-, DNA-, Protein- und LDH-Konzentration) vor allem lebertypische Prozesse, wie die Albuminsynthese oder die CYP-abhängigen Monooxygenierungen von Xenobiotica (Müller et al., 1996, 1998). Glöckner et al. gelang der Nachweis einer CYP-Induktion durch  $\beta$ -Naphthoflavon über die Untersuchung einer CYP-abhängigen Reaktion, der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (Glöckner et al., 1995). Der Nachweis des bekannten Induktionsvermögens des  $\beta$ NF (Lake et al., 1993) erfolgte in LS, was u.a. eine Bestätigung dieses In-vitro-Modells auf der Ebene der Monooxygenaseaktivität war.

Erfolgt der Induktionsnachweis über CYP- vermittelte Monooxygenierungen, bedarf es dabei einer vergleichsweise langen Behandlung der LS mit dem Substrat. In diesem Behandlungszeitraum nimmt die Grundaktivität des CYP kontinuierlich ab. Durch die Induktion lässt sich zum Teil nur noch die Ausgangsaktivität des Enzyms erreichen (Müller et al., 1996, 1998). Ein „Aktivitätszuwachs“ des CYP als Ausdruck der Induktion wird unter Umständen nicht mehr nachgewiesen, wenn z.B. schwach induzierende oder Substanzen in kleinen Konzentrationen zur Induktion verwendet werden. Auf diese Weise wird die Empfindlichkeit oder Sensitivität eingeschränkt.

## 2. ZIELSTELLUNG

Die jüngsten Entwicklungen molekularbiologischer Techniken, zu denen die RT-PCR gehört, ermöglichen den quantitativen Nachweis spezifischer mRNA. Damit ergibt sich ein Zugang für die Erfassung der Induktion des CYP auf der Ebene der Transkription.

Mit der RT-PCR sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation versucht werden, erstmalig an Präzisionsleberschnitten eine In-vitro-Induktion der mRNA des Isoenzym CYP1A1 durch  $\beta$ NF nachzuweisen.

Dafür mußten die aus der Literatur entnommenen Protokolle zum CYP-mRNA-Nachweis (Hodgson et al., 1993) an die Bedingungen der LS adaptiert werden.

Die Befunde der In-vitro-Untersuchungen wurden zur Darstellung ihrer biologischen Relevanz mit In-vivo-Untersuchungen verglichen (Vorbehandlung der Ratten 24 h).

Die Quantifizierung der CYP1A1-mRNA erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden, (1) der densitometrischen Auswertung der mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellten Reaktionsprodukte und (2) der kompetitiven RT-PCR.

Die Methoden und ihre Ergebnisse wurden untereinander und mit denen der im Vorfeld bestimmten Änderung der Monooxygenaseaktivität nach 24-stündiger  $\beta$ NF Induktion verglichen.

Im Laufe der praktischen Arbeit ergaben sich zusätzliche Fragestellungen. So zeigte sich CYP1A1-mRNA bei einigen Proben aus Leber und LS von *Kontrolltieren*. Dieses Isoenzym ist zahlreichen Publikationen zufolge erst nach dessen Induktion in der Leber vorhanden. Andererseits weisen jedoch einige Autoren auf nachweisbare geringe Konzentrationen an CYP1A1 in Kontrollproben hin (Lupp et al., 1998, 2001). Zur Klärung dieser widersprüchlichen Befunde sollte beigetragen werden.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Gewinnung des Probenmaterials aus Versuchstieren**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Die Untersuchungen wurden an 10 bis 43 d alten, männlichen Wistar-Ratten (Han: Wist) aus der Zucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h, einer Raumtemperatur von 22 bis 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 45-60%. Die Wurfgröße wurde auf maximal 6 Tiere begrenzt. Die Jungtiere blieben bis zum 30. Tag beim Muttertier und wurden in dieser Zeit überwiegend durch Muttermilch ernährt. Anschließend wurden sie vom Muttertier getrennt. Die Aufzucht erfolgte mit Standardfutter (Altromin®) und Wasser ad libitum.

Die Versuchstiere wurden durch Dekapitation in Äthernarkose getötet.

##### **3.1.2. Gewebegewinnung**

###### Untersuchungen zum Nachweis der Induktion des CYP1A1 in vivo

Für den Nachweis der Induktion der CYP1A1 wurden 24 h vor Dekapitation der Ratten einmalig 50 mg  $\beta$ NF (Serva®, Heidelberg, gelöst in Sonnenblumen-Öl) pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Die Kontrolltiere blieben unbehandelt.

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Leber freipräpariert und von den Gefäßen befreit, in Krebs-Henseleit-Puffer gespült und anschließend in ca. 50 mg schwere Gewebestücke zerteilt. Die so gewonnenen

Leberproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (-176 °C) und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

#### Untersuchungen zum Nachweis der Induktion des CYP1A1 in vitro

Das präparierte Lebergewebe wurde in Krebs-Henseleit-Puffer gespült. Aus diesem Präparat wurden Zylinder (Durchmesser 8 mm) gestanzt. Aus einem Zylinder wurden mit dem Krumdieck-Tissue-Slicer, der mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt war, Präzisionsschnitte von etwa 250 µm Dicke hergestellt.

Zur Stabilisierung des Stoffwechsels wurden die LS bei allen In-vitro-Untersuchungen vorinkubiert.

Dafür wurden maximal 12 Schnitte in ein Erlenmeyerkölbchen mit 10 ml Williams-Medium E (pH 7,4) überführt und bei 37 °C unter Begasung mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) und Schütteln (100/ min) über 2 h präinkubiert.

Die Inkubation der Schnitte erfolgte in 10 ml modifiziertem Williams-Medium E, das zuvor über 25 Minuten mit Carbogen begast worden war. Temperatur, Begasung und Schütteln der Schnitte waren identisch mit denen bei der Präinkubation. Zur Induktion des CYP1A1 in den LS wurde dem Inkubationsansatz βNF gelöst in DMSO zugesetzt (Endkonzentrationen: 2,5 mM βNF und 0,1% DMSO).

Die Kontrollschnitte wurden mit der entsprechenden Menge an DMSO behandelt. Die Inkubation dauerte je nach Versuch bis zu 48 h.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte aus dem Medium herausgenommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren (-176 °C). Die Aufbewahrung erfolgte bei einer Temperatur von -80 °C.

### 3.1.3. Materialgewinnung

#### Lösungen

I. Williams Medium E®

II. Krebs-Henseleit-Puffer:

NaCl	60 mM
KCl	2,4 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,6 mM
CaCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,625 mM
NaHCO <sub>3</sub>	12,5 mM

gelöst in aqua bidest.

Der Puffer wurde mit 1M NaOH oder 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt und 30 Minuten mit Carbogen begast.

III. Modifiziertes Williams Medium E® - je 100 ml Williams Medium E®:

Ampicillin	1 mg
Gentamicin	125 mg
Glutamin	29,2 mg
Insulin	345 mg
Tylosin	10 mg

Vor der Verwendung des Mediums oder des Puffers wurden diese jeweils für 25 Minuten mit Carbogen begast.

## **3.2. Bestimmungsmethoden**

### **3.2.1. Gewinnung und Reinigen der Gesamt-RNA aus Lebergewebe**

#### Prinzip der Methode

Die RNA ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert.

Die Isolierung der gRNA beginnt mit dem mechanischen Aufschluß des Gewebes in einem hypotonen Lysispuffer, der gleichzeitig zu einer Denaturierung und Sedimentation von Biomembran führt. Die so gewonnene zytosolische Fraktion enthält allerdings neben RNA auch DNA, die in der weiterführenden Untersuchung stört. Daher wurde die zytosolische Gewebefraktion mit einem DNA-Adsorber behandelt. Dieser bindet die DNA und entfernt sie aus der löslichen Gewebefraktion.

Die lösliche Gewebefraktion enthält zudem RNAsen, die zu einer Zerstörung der RNA während der Aufarbeitung des Gewebes führen können. Um dies zu verhindern, wurde dem Homogenisationspuffer ein RNase-Inhibitor (RNAsin) zugesetzt. Außerdem wurde bei der Herstellung von Puffern und Inkubationsmedien stets RNase-freies aqua bidest. verwendet.

Die Isolierung der gRNA aus der löslichen Gewebefraktion erfolgte durch eine Phenolextraktion. Dabei wird mit einfachem Ausschütteln eine RNA-haltige, wäßrige Oberphase, eine proteinhaltige Interphase sowie eine phenolische Unterphase (mit Proteinen und Rest-DNA) hergestellt.

Die anschließende Isopropanol-Behandlung der wäßrigen Phase bedingt ein Ausfällen der gRNA, die durch Zentrifugation abgetrennt und durch Waschen mit 70%-igem Ethanol gereinigt wird.

#### Materialien

Zentrifuge, Potter-Elvehjem-Homogenisator, Probenmischgerät (Vortex), Eisbad

### Lösungen und Chemikalien

Ethanol (70%ig, Verwendung von RNase-freiem Wasser), Phenol (Tris gepuffert), Chloroform.

InViSorb™ RNA Kit II (In-Vitec, Berlin, Germany):

Adsorbin, Puffer A, Lysis-Puffer, Isopropanol-ultra pur, PBS Puffer, TE-Puffer (RNase-frei), aqua bidest. (nukleasefrei).

### Durchführung

- Mechanisches Homogenisieren des Gewebematerials (maximal 50 mg) in 500 µl Lysis-Puffer
- Zugabe von 30 µl Adsorbin (kurzes und kräftiges Schütteln der Probe),
- Homogenat für 5 min im Eisbad stehen lassen, anschließend zentrifugieren (10', bei 4°C, 12000 rpm)
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überpipettieren
- Zugabe von 500 µl Phenol (Tris-gepuffert), 50 µl Puffer A und 100 µl Chloroform – kräftig durchschütteln
- Inkubieren (5', 0°C) und zentrifugieren (10', bei 4°C, 12-14000 rpm)
- Überpipettieren der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol (kurzes Schütteln)
- Präzipitation der gRNA (20', -20°C) und anschließendes Abzentrifugieren (5', bei 4°C, 12000 rpm)
- Das Pellet wird dreimal in 1ml Ethanol (70%ig) durch kurzes Auf- und Niederpipettieren gewaschen
- Abschließend: Lufttrocknung der pelletierten RNA

### **3.2.2. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der aus Lebergewebe isolierten Gesamt-RNA**

#### Prinzip der Methode

Die Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Diese Eigenschaft wird zur Konzentrationsbestimmung genutzt. Eine ausreichend genaue Quantifizierung des RNA-Gehaltes der Probe wird erreicht, wenn man zugrundelegt, daß bei einem Lichtweg von 1 cm (Küvettdicke) ein Extinktionswert (OD) von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht (Manitas et al., 1989).

Das Absorptionsmaximum für Proteine unterscheidet sich von dem der RNA und liegt bei 280 nm, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste.

Durch Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm kann der relative Anteil der RNA in der isolierten Fraktion ermittelt werden. Proben mit einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 wurden für die anschließende RT verwendet. Ein kleinerer Quotient deutet auf eine erhebliche Kontaminationen der Probe mit Proteinen (eventuell auch mit Phenol) hin. Derartige Proben wurden verworfen.

### Materialien

Photometer, zwei Quarzküvetten (Schichtdicke 1cm)

### Durchführung

- Lösen des luftgetrockneten RNA-Präzipitats in 1ml nukleasefreiem aqua bidest.
- 0,5 ml Aliquot mit 1,5 ml Wasser ergänzen
- Extinktionsbestimmung bei 260 nm und 280 nm in Quarzglasküvetten zur Bestimmung der Konzentration der gRNA sowie der Reinheit der Probe

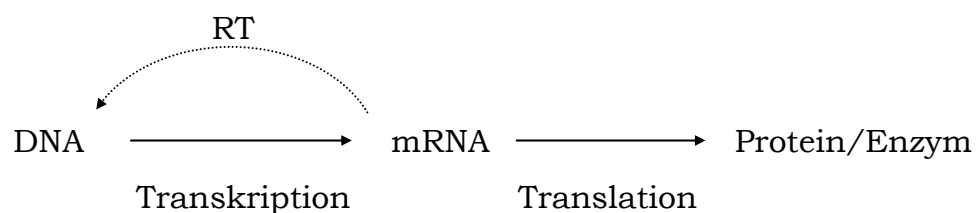


### 3.2.3. Die reverse Transkription (RT)

#### Prinzip der Methode

Die Erbinformation fließt von der DNA über eine Zwischenstufe (mRNA) zum Protein bzw. Enzym (Abbildung 3-1). Auf diesem Prinzip des Informationsflusses über Transkription und Translation basiert die Genexpression (zentrales Dogma).

Abbildung 3-1: Schema des zentralen Dogmas, Informationsfluß in eine Richtung, Ausnahme reverse Transkription (RT). Erklärung siehe Text.



In der Transkription wird eine mRNA synthetisiert, wofür eine DNA-Vorlage als sogenannte Matrize notwendig ist. RNA-Polymerasen synthetisieren in der Transkription auch tRNA und rRNA, die für die anschließende Translation in den Ribosomen notwendig sind.

Bei der RT wird die einzelsträngige RNA in ein doppelsträngiges cDNA-mRNA-Hybrid überführt. Die genetische Information fließt entgegen der konventionellen Richtung, was in Abbildung 3-1 dargestellt ist (Nicholl et al., 1995). Dafür benötigt man die auch in Retro-Viren vorhandene reverse Transkriptase (RTase). Dieses Enzym ist in der Lage, eine komplementäre cDNA herzustellen. Dies geschieht mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern, die an der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der mRNA gebunden werden und somit den notwendigen Startpunkt für die RTase bilden.

Unter diesen Voraussetzungen synthetisiert die RTase unter Verbrauch von Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTPs) eine Kopie der mRNA, das erwähnte cDNA-mRNA-Hybrid.

Damit ist es z.B. möglich, die durch  $\beta$ NF induzierte CYP1A1-mRNA über die cDNA in der sich anschließenden PCR zu vervielfältigen.

Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der RT mit Oligo(dT)-Primern.  
Erklärung im Text.

## I. Ausgangsmaterial

5' AAAAA-3'

mRNA in gRNA

## ~~II. Reverse Transkription~~

Primer-Anlagerung (5', 42°C)

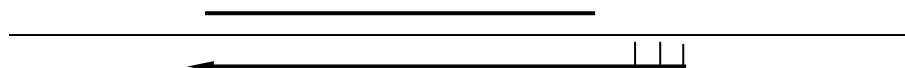
5' AAAAA-3'

Oligo(dT)-Primer

Neusynthese von cDNA durch Verlängerung (30', 42°C)

5' AAAAA-3'

cDNA-mRNA-Hybrid



### Chemikalien und Lösungen für RT-Ansatz

Bestandteil	Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.
<hr/>	
Reaktionspuffer	
Tris-HCl, pH 8,3 [25°C];	1 mM
KCl,	5 mM
Triton X-100, pH 8,8 [25°C]	0,01%
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
rRNasin (RNase-Inhibitor)	1 u/μl
Oligo d(T) <sub>15</sub> -Primer	0,5 μg/μl
dNTP-Mix	1 mM
RTase*	15 u/μl
gRNA	0,05 μg/μl

\*AMV aus Avian Myeloblastosis Virus (von Promega, Madison, WI, USA)  
(Goodman und MacDonald 1979, Miller und Storts 1995)

### Durchführung

- 1 μg gRNA wird in einem Gesamtvolumen von 20 μl Reaktionsansatz gelöst und bei 42°C über 30 min inkubiert (RT).

### **3.2.4. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

#### Prinzip der Methode

Diese In-vitro-Methode zur selektiven, exponentiellen Amplifikation von DNA wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, wofür er 1993 mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet wurde.

Die PCR basiert auf folgendem Prinzip:

Wird die in der RT entstandene doppelsträngige Nukleinsäure erhitzt, kommt es zur Trennung beider Stränge (Denaturierung). Dadurch können

sich die dem Ansatz zugebenden spezifische Oligonukleotidmoleküle (Primer) an die Matrizenstränge anlagern (Annealing). Dies erfolgt dort, wo die Primersequenz mit der der einzelsträngigen Matrize übereinstimmt. Die Primer werden von einer Taq-DNA-Polymerase, einem Replikationsenzym, das ursprünglich aus Mikroorganismen heißer Quellen (*Thermus aquaticus*) extrahiert wurde, in Anwesenheit freier Desoxy-Nukleosid-Triphosphate (dNTPs) von 5' nach 3' verlängert (Elongation). Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 95°C wird der entstandene Doppelstrang aufgespalten.

In Anwesenheit freier Primer binden diese bei Abkühlung des Reaktionsansatzes auf die primerspezifische Anlagerungs- bzw. Annealingtemperatur erneut an die entsprechenden Sequenzen der Matrize. Die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann jetzt wiederholt werden. Auf diese Weise lassen sich mit nur wenigen Wiederholungen dieses Reaktionszyklus viele Kopien der Zielsequenz herstellen.

Für die PCR benötigt man *theoretisch* nur einen Nukleinsäureabschnitt, aus dem wegen der enormen Effizienz nach 25 Reaktionszyklen bereits  $3,4 \times 10^7$  Kopien synthetisiert werden können.

Abbildung 3.3a: Primärsequenz der CYP 1A1 und Abschnitte des Primer-Annealing (markiert).

1	TCTCCATAGC	CTCAGACCCC	ACATCAGTAT	CCTCTTGCTA	CTTGGAGGAG
51	CACGTGAGCA	AAGAGGCTAA	CCATCTAATC	AGCAAGTTCC	AGAAGCTGAT
101	GGCAGAGGTT	GGCCACTTCG	AACCAGTCAA	CCAGGTGGTG	GAATCGGTGG
151	CTAATGTCAT	CGGAGCCATG	TGTTTTGGGA	AGAACTTCCC	TAGGAAGAGC
201	GAGGAGATGC	TCAACCTCGT	GAAGAGCAGC	AAGGACTTTG	TGGAGAATGT
251	CACCTCAGGG	AATGCTGTGG	ACTTCTTTCC	GGTCCTGCGC	TACCTGCCCA
301	ACCCAGCCCT	CAAGAGGTTT	AAGAACTTCA	ATGATAACTT	TGTGCTGTTT
351	CTGCAGAAAA	CAGTCCAGGA	ACACTATCAA	GACTTCAACA	AGAACAGTAT
401	CCAGGACATC	ACAGGCGCCC	TGTTCAAGCA	CAGTGAGAAC	TACAAAGACA
451	ACGGTGGTCT	CATCCCTCAG	GAGAAGATTG	TCAACATTGT	CAATGACATC
501	TTTGAGGCTG	GATTTGAAAC	AGTCACAACA	GCCATCTTCT	GGAGCATTTT
551	GCTACTTGTG	ACAGAGCCCA	AGGTGCAGAG	GAAGATTCAT	GAGGAGCTGG
601	ACACGGTGAT	TGGCAGAGAT	CGGCAGCCAC	GGCTTTCTGA	CAGACCCCAG
651	CTGCCATATC	TGGAGGCCTT	CATCCTGGAG	ATCTACCGAT	ACACATCCTT
701	TGTCCCCTTC	ACCATCCCCC	ACAGCACAAC	GAGGGACACC	TCACTGAATG
751	GCTTCCACAT	TCCCAAGGAG	TGCTGCATCT	TCATAAACCA	GTGGCAGGTC
801	AACCATGATG	AGAAGCAGTG	GAAAGACCCC	TTTGTGTTCC	GCCCAGAGCG
851	GTTTCTTACC	AATGACAACA	CGGCCATCGA	CAAGACCCTG	AGTGAGAAGG
901	TGATGCTCTT	CGGCTTGGA	AAGCGCGGT	GCATTGGGGA	GATCCCGGCC
951	AAGTG <b>GGAAG</b>	TCTTCCTCTT	CTTAGCCATC	CTCCTGCATC	AGCTGGAGTT
1001	CACTGTGCCA	CCGGGCGTGA	AGGTGGACCT	GACACCCAGC	TATGGGCTGA
1051	CCATGAAGCC	CAGAACCTGT	GAACACGTCC	AGGCCTGGCC	ACGCTTCTCC
1101	AAGTGA				

### Material

Thermocycler, Eisbad, Reaktionsgefäße

### Lösungen und Chemikalien

#### I. Primer

##### β-Actin (up):

ACC TTC AAC AAC CCA GCC ATG TAC G

##### β-Actin (down):

CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G

##### CYP1A1 (up):

GAT GCT GAG GAC CAG AAG ACC GC

##### CYP1A1 (down):

CAG GAG GCT GGA CGA GAA TGC

(Yabusaki et al., 1984).

II. Für  $\beta$ -Actin-PCR:

Komponente	Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.
------------	---

## Reaktionspuffer

Tris-HCl,	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH=8,55; T= 4°C)	1,6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP Mix (25 mM je dNTP)	0,2 mM
$\beta$ -Actin-Primer up	50 pmol
$\beta$ -Actin-Primer down	50 pmol
Taq-Polymerase	80 u/ml
cDNA	4 (8) $\mu$ g gRNA/ml*

\* in 2(4)  $\mu$ l cDNA: mit (ohne)  $\beta$ NF-Behandlung.

## III. Für CYP1A1-PCR:

Zusammensetzung entspricht der  $\beta$ -Actin-PCR außer:

Komponente	Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.
------------	---

CYP1A1-Primer up**	2 mM
CYP1A1-Primer down**	2 mM
cDNA	4 $\mu$ g gRNA/ml

\*\*von Pharmacia, Freiburg, Germany

## IV. Mineralöl

Durchführung

- Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes beträgt 25  $\mu$ l.
- mit Mineralöl bedecken
- PCR im Thermocycler lt. folgenden Programmen:

 $\beta$ -Actin-PCR:

4' 95°C, 4 Zyklen: 30'' 94°C, 1' 59°C, 30'' 72°C dann 36 Zyklen: 20'' 94°C, 20'' 59°C, 30'' 72°C insgesamt 40 Zyklen.

CYP1A1-PCR:

4' 95°C, 4 Zyklen: 30'' 94°C, 1' 59°C, 30'' 72°C dann 26 Zyklen: 20'' 94°C, 20'' 59°C, 30'' 72°C insgesamt 30 Zyklen.

**3.2.5. Die Gelelektrophorese**Prinzip der Methode

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Anzahl ihrer Basenpaare bzw. ihres Molekulargewichtes. Die Mobilität der bei neutralem pH-Wert polyanionischen Nukleinsäuren im elektrischen Feld beruht darauf, daß sie wegen ihrer vielen negativen Ladungen zur positiven Elektrode wandern (Nicholl et al., 1995). Als Gelmatrix und festes Trägermaterial wurde Agarose (aus Seetang) verwendet, deren Trennungseigenschaften konzentrationsabhängig ist. Ein 0,7%iges Agarose-Gel besitzt einen Trennungsbereich von 300 bis 20000 bp.

Dem Gel wurde Ethidiumbromid zugesetzt. Dieser Farbstoff kann sich aufgrund seiner planaren Molekülstruktur zwischen die übereinanderliegenden ebenfalls planaren Basen der dsDNA lagern.

Ethidiumbromid besitzt im UV-Licht eine geringe Eigenfluoreszenz. Tritt es in Wechselwirkung mit den Basen der dsDNA verstärkt sich die Fluoreszenz. Dadurch erscheinen im Agarose-Gel die Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe als orange- bis rosafarben fluoreszierende Banden. Das Elektropherogramm wird damit sichtbar.

DNA-Standards (Marker) mit definierter Größe erlauben eine Zuordnung der Molekülgröße der getrennten Nukleinsäure. Dabei ist die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Basenpaarzahl. Die Wahl des Längenstandards hängt von der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente ab.

### Lösungen und Chemikalien

- I. Laufpuffer (Tris, Borsäure, EDTA, nukleasefreies Wasser)
- II. Wasser (nukleasefrei)
- III. Agarose (Pulver)
- IV. Ethidiumbromid
- V. Beladungspuffer mit Bromphenol-Blau
- VI. Marker (603, 875, 1078, 1378 bp)

### Geräte

Horizontal-Elektrophorese-System, Stromversorgungsgerät (Gleichstrom, 100V), Heizplatte, UV-Lichtkasten

### Durchführung

- 10 µl des PCR-Produkts werden mit 2,0 µl Beladungspuffer inklusive Bromphenol-Blau versetzt.
- 0,7%iges Agarosegel (0,7 g Agarose, 35 ml Laufpuffer, 35 ml nukleasefreies Wasser, 35 µl Ethidiumbromid) kurzzeitig sieden
- Agarosegel bei einer Temperatur von 50-60°C in die Gelwanne des Elektrophoressystem gießen, Kämme für die Probentaschen einsetzen
- nach Abkühlen geliert die Agarose, Proben (11 µl) auftragen
- Gel in der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer bedecken („submariner Elektrophorese“)
- Elektrophorese (45', 100 V)



### **3.2.6. Dokumentation der Elektropherogramme**

#### Fotografische Dokumentation

Die Elektrophoresemuster werden mit einer speziell entwickelten Polaroid®- Kamera dokumentiert. Dazu wurden die Gele auf einen Lichtkasten gelegt und mit UV-Licht durchleuchtet.

#### Dokumentation und Auswertung mit ImageMaster-VDS

Durch die technische Entwicklung ist es möglich, das Elektropherogramm schnell und einfach mit einem Videodokumentations-System (VDS) aufzuzeichnen und anschließend mit Hilfe einer bildverarbeitenden Software im PC auszuwerten. Gemessen wird dabei die Intensität der Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid angefärbten Nukleinsäurebanden. Die registrierte Farbintensität wird im Zuge der Bildverarbeitung zu einer dimensionslosen Pixelzahl (Signal) digitalisiert.

Eine Bestimmung der Nukleinsäuremengen wird durch den Vergleich des Signals der untersuchten Probe mit dem definierter Mengen von Standardsubstanzen ermöglicht (Gallagher et al., 1989; Rye et al., 1992; Zhu et al., 1994, ImageMaster VDS Instruction).

Andererseits können auch verschiedene Proben semiquantitativ verglichen werden.

#### Geräte

Polaroid®- Kamera

VDS-System: ImageMaster VDS (Pharmacia-Biotech), Personalcomputer mit Image Captur Kit (Pharmacia-Biotech), Image Master VD-Software (Pharmacia-Biotech)

#### Durchführung I

- Dokumentation mit einer Polaroid®-Kamera bei fester Brennweite, Orange-Filter.

### Durchführung II- ImageMaster-Videodokumentations-System

- Die VDS-Parameter zur Herstellung eines Scans bzw. Bilddokumentes entsprechen denen der Anwendungsanleitungen 1 und 3 des Herstellers:
  - zur Aufnahme des Bilddokuments:  
Time = 0,4 s, Blev = 6, Gain = 0, Gamma = 0,45
  - für den Export zum PC:  
Time = 0,33-0,6 s, Blev = 6, Gain = 0, Gamma = 1,0.
- Die Auswertung des so aufgenommenen Bilddokuments (Image Analyse) erfolgt nach dessen Export in den Personal-Computer. Die dazu notwendige Software (Image VDS Software) ist in der Lage, die Intensitäten der Banden zu erfassen und entsprechend in Pixel bzw. dimensionslose Zahlenwerte (Signal) umzurechnen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte stets standardisiert.

### **3.2.7. Die kompetitive RT-PCR**

#### Prinzip der Methode

Die kompetitive RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von mRNA. Bei der RT der Nativ-RNA wird eine Eich-RNA als interner Standard mit bekannter RNA-Konzentration mitgeführt. Die Eich- und die Nativ-RNA aus den LS besitzen z.T. identische RNA Sequenzen, weshalb es zur „Konkurrenz“ zwischen Standard und Probe um die Primer kommt.

Für die Quantifizierung der Nativ-mRNA werden von der Eich-RNA Verdünnungen mit bekannter RNA-Konzentration vorbereitet, diese zusammen mit der Nativ-gRNA transkribiert und nachfolgend in der PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden gelektrophoretisch getrennt, und die Banden mittels VDS verglichen. Während die Bande der Eich-RNA bei zunehmender Verdünnung abnimmt, nimmt die Intensität der Nativ-mRNA nach der PCR zu. Bei Übereinstimmung von Proben- und Standardprodukt (Abbildung 3-4, Pfeil) kann auf die RNA-Konzentration

der Probe geschlossen werden und die molare Stoffmenge berechnet werden.

Durch die Kompetition wird unter optimalen Bedingungen dann gleich viel PCR-Produkt von Eich- und Nativ-RNA gebildet, wenn im Reaktionsansatz beide Templatekonzentrationen gleich groß waren. Aus der bekannten Eich-RNA-Konzentration kann so auf die Konzentration der Nativ-RNA geschlossen werden.

### Lösungen und Chemikalien

#### I. RNA-Mengen für die RT: siehe 3.2.3

- Standard-RNA: 1 µg RNA für internen Standard (van den Heuvel et al., 1993).
- gRNA aus Gewebe: nach βNF-Behandlung: 1 µg  
Kontrolle: 2 µg

#### II. Für CYP1A1-PCR: siehe 3.2.4.

Parameter	Endvolumen [µl]	Endkonzentration [mM]
Primer up		2,1
Primer down		2,1
cDNA*	2(4)µl*	

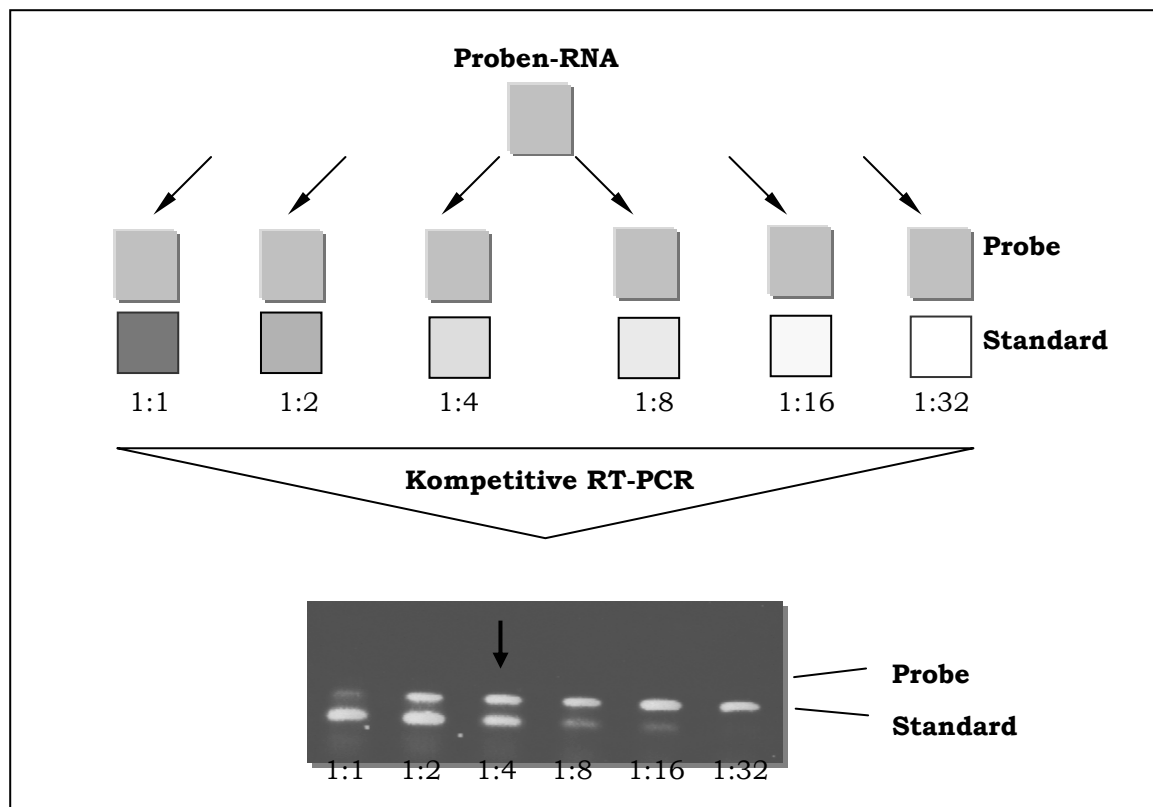
\*aus Gewebe mit (ohne) βNF-Behandlung (6h)

#### III. Primer :

Primer (up)-Sequenz : 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTA  
GAC ACT GAT CTG GCT GCA G- 3'

Primer (down)- Sequenz : 5'- TTT TTT TTT TTT TTT CTG AAG CCA  
GTC AGC ACC CTC ATC TTC AGA GCT  
TCT GAG- AGG CCT- 3'

Abbildung 3-3: Prinzip der kompetitiven RT-PCR. Verdünnungen der Standard-RNA mit bekannter RNA-Konzentration werden mit der Nativ-Probe transkribiert und in der PCR vervielfältigt. Bei Übereinstimmung der mRNA-Banden von Proben- und Standardprodukt nach der PCR (Pfeil), kann die RNA-Konzentration der Probe durch Vergleich ermittelt werden.



### Durchführung

siehe RT-, PCR-, Elektrophorese-Durchführung (3.2.3 und ff.)

### 3.3. Methodische Voruntersuchungen zur Bestimmung von CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition

Im Abschnitt „Methodische Voruntersuchungen“ wird das entscheidende Ergebnis, nämlich der Nachweis einer In-vitro-Induktion der CYP1A1-mRNA durch  $\beta$ NF vorweggenommen (siehe 4.1. ff.).

Wegen kaum nachweisbarer CYP1A1-mRNA in den LS von Kontrolltieren fanden die Versuche zur Optimierung der RT-PCR an induzierten Schnitten statt (siehe 4.2. ff.).

#### 3.3.1. Gewinnung der Gesamt-RNA

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad der aus Lebergewebe gewonnenen gRNA erfolgte mit Hilfe der Spektrometrie in aqua bidest. (siehe 3.2.2.).

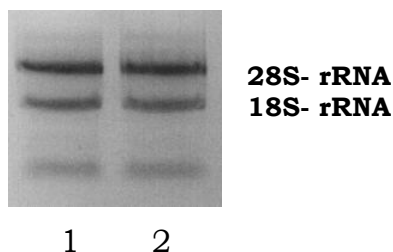
Die Tabelle 3-1 zeigt beispielhaft die Konzentrationsbestimmung der aus Leberschnittgewebe gewonnenen gRNA einer 40 d alten männlichen Hannover-Wistar-Ratte. Die LS wurden 24 h mit  $\beta$ NF behandelt.

Tabelle 3-1: Reinheitsgrad (f) und Konzentration (C) von gRNA aus einer Leberschnittprobe

E 260 [nm]	E 280 [nm]	f	C [ $\mu$ g/ ml]
1,030	0,552	1,9	220,0

Die Qualitätsprüfung der gewonnenen gRNA erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-4 dargestellt.

Abbildung 3-4: Zwei Proben gRNA aus  $\beta$ NF induzierten LS (24h) in 1%igen Agarosegel. Nachweis der 18S- und 28S-rRNA Untereinheiten als Qualitätskriterium. S: Sedimentationskoeffizient.

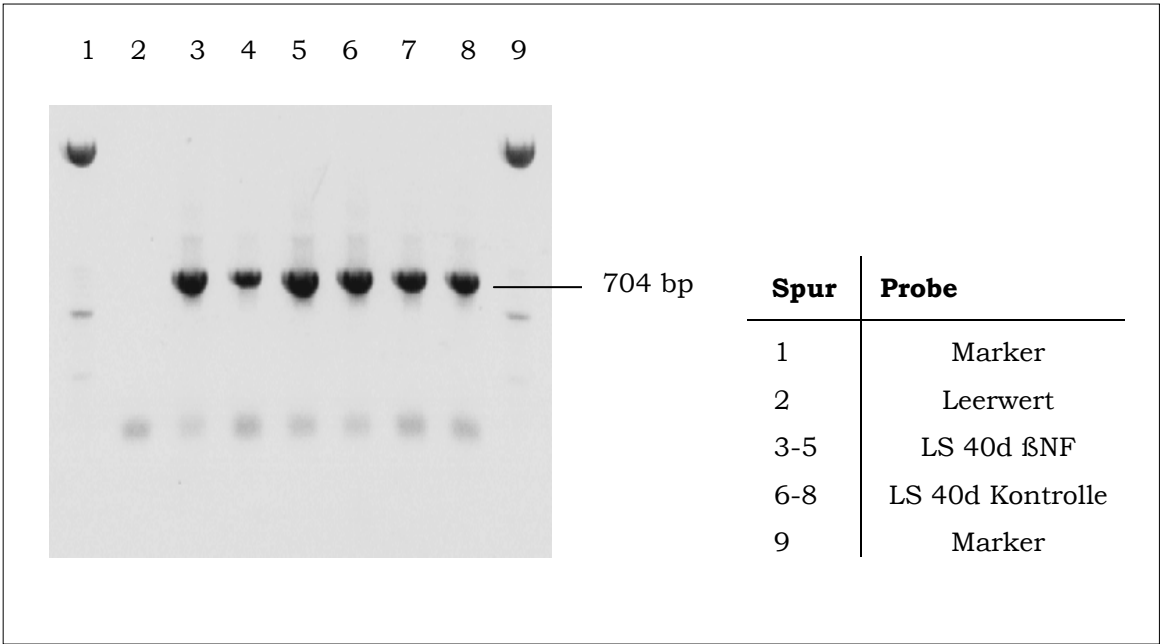


Das Elektropherogramm der gRNA-Probe erlaubt keine Beurteilung der mRNA. Das eindeutige Vorhandensein der 18 S- und 28 S- rRNA Bande (28S > 18S) gilt als Kriterium für eine intakt isolierte gRNA einschließlich der mRNA (Nicholl et al., 1995). Es wurden nur solche RNA-Präparate in die weiterführenden Untersuchungen einbezogen, die diesem Kriterium entsprachen.

### 3.3.2. RT-PCR

Zur Überprüfung der Effizienz der RT und PCR der CYP1A1-mRNA wurde eine PCR mit spezifischen  $\beta$ -Actin-Primern durchgeführt. Diese Methode ist ein etabliertes Verfahren (Lion 1996). Im Gegensatz zur Konzentration von CYP1A1-mRNA, die je nach Induktionsstatus starken Schwankungen unterworfen ist, ist die  $\beta$ -Actin-mRNA unabhängig von den verschiedenen Vorbehandlungen. Unter den gewählten Bedingungen konnte die entsprechende cDNA eindeutig gebildet werden (Abbildung 3-5). Das Produkt (704 bp) ist in seiner Menge konstant, wenn man die Ergebnisse nach 24-stündiger  $\beta$ NF-Einwirkung (Spur 3-5) mit denen der unbehandelten Kontrollen (Spur 6-8) vergleicht.

Abbildung 3-5: PCR mit spezifischen  $\beta$ -Actin-Primern zur Überprüfung der RT und PCR in LS 40 d alter Ratten aus Kontrollgewebe bzw. nach 24-stündiger  $\beta$ NF-Einwirkung. Unabhängig von der Vorbehandlung resultiert ein vergleichbare Menge  $\beta$ -Actin-mRNA.

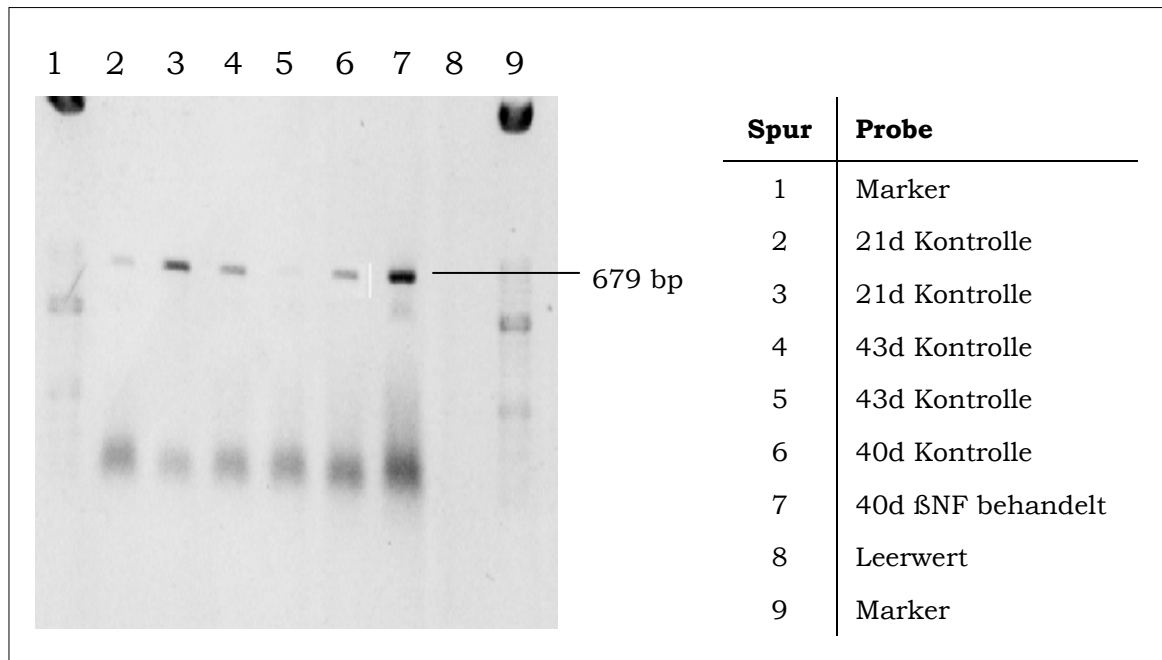


Die  $\beta$ -Actin-PCR war für uns Hinweis auf eine intakte gRNA und erfolgreiche RT und somit Voraussetzung für die folgenden Untersuchungen zum Nachweis der CYP1A1-mRNA-Induktion in den LS. Abbildung 3-6 zeigt beispielhaft die CYP1A1-mRNA von Kontrollproben unterschiedlichen Alters (Spuren 2–6) und von LS nach 24-stündiger In-vitro-Behandlung mit  $\beta$ NF (Spur 7).

Das Produkt hat eine Größe von 679 Basenpaaren.

Es wird eine deutliche Zunahme der gebildete CYP1A1-mRNA nach In-vitro-Vorbehandlung mit  $\beta$ NF beobachtet (Vergleich Spuren 2-6 und 7).

Abbildung 3-6: PCR zum Nachweis von CYP1A1-mRNA in LS von Kontrolltieren (Spuren 2-6) und in Schnitten nach 24-stündiger In-vitro-Einwirkung von  $\beta$ NF (Spur 7).



### 3.3.3. Dokumentation und Auswertung

#### Beziehung zwischen der aufgetragenen cDNA-Menge und dem mittels VDS erfaßten optischen Signals im Elektropherogramm

Mit diesen Voruntersuchungen sollte die Funktion zwischen dem Signal und der entsprechenden CYP1A1-mRNA-Bande dargestellt werden. Dabei wurde das Ziel verfolgt, den Konzentrationsbereich zu erfassen, in dem eine lineare Beziehung zwischen diesen beiden Größen besteht.

Hierfür wurden von einem Tier 12 LS über 24 h in Anwesenheit von  $\beta$ NF inkubiert. Von dieser gRNA wurden je 1  $\mu$ g transkribiert (n=3), und anschließend die cDNA in der PCR amplifiziert. Nach erfolgter PCR wurden mit den jeweiligen Produkten eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt. Die einzelnen Proben wurden jeweils der



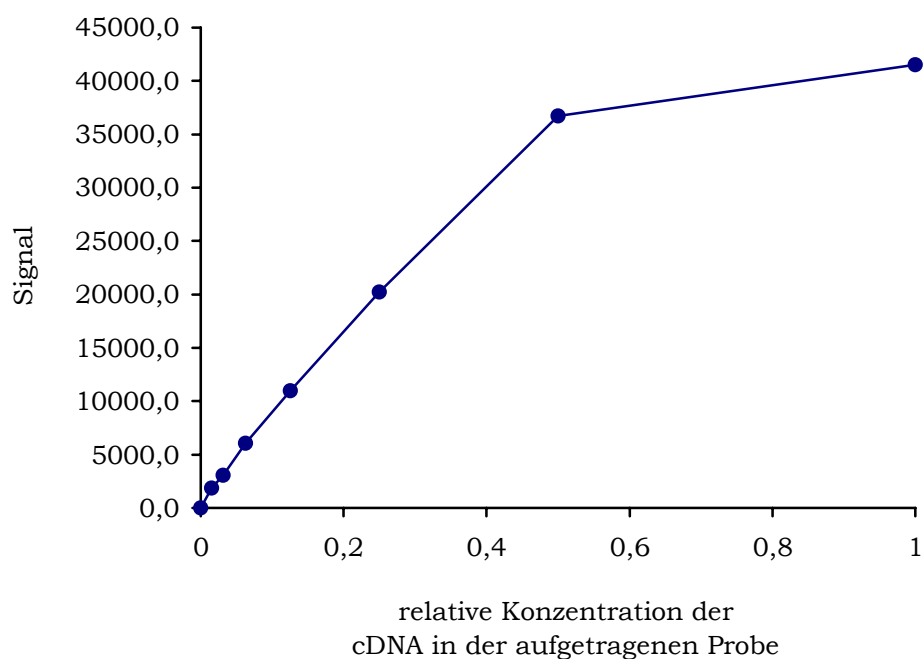
Elektrophorese zugeführt und die Bande mittels VDS gemessen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Die Beziehung zwischen Produktmenge und dem optischen Signal ist im Bereich 0 und 36000 linear ( $r= 0,9964$ ). Bei höheren Konzentrationen nähert sich die Relation zwischen Produkt und Signal asymptotisch einem Grenzwert. Diese Beziehung konnte in drei Versuchsansätzen bestätigt werden.

Tabelle 3-2: Beziehung zwischen der aufgetragenen Menge an CYP1A1-PCR-Produkt  $\beta$ NF-behandelter LS und dem mittels VDS gemessenen optischen Signal der CYP1A1-mRNA-Bande.  $n=3$ .

<b>Aufgetragene Probe</b> (Verhältnis PCR- Produkt zu aqua bidest. (V/V))	<b>Signal</b> ( $\xi$ )	<b><math>\pm s</math></b>	<b>log Signal</b>
0 (Blank)	0	0	
0,0156	1871,0	221,3	3,27
0,0313	3059,5	221,3	3,49
0,0625	6089,0	555,8	3,79
0,125	11000,5	2366,7	4,04
0,25	20222,5	2395,0	4,31
0,5	36730,5	1003,4	4,57
1	41511,5	3370,8	4,62

Diagramm 3-1: Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der aufgetragenen Menge an CYP1A1-PCR-Produkt ßNF-behandelter LS und dem mittels VDS gemessenen optischen Signal der entsprechenden Bande. Werte siehe Tab. 3-2. n=3.



#### Präzision der Auswertung (Elektrophorese und VDS)

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Gelelektrophorese und VDS-Auswertung auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft. Dazu wurden aus einem entsprechen großen PCR-Ansatz parallel 6 Proben gelelektrophoretisch getrennt und mit der VDS ausgewertet. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-3 ausgewiesen und zeigt einen mittleren relativen Fehler ( $\xi/s \times 100$ ) zwischen den einzelnen Proben von 6,76%.

Tabelle 3-3: Voruntersuchung, Präzision in Serie (LS mit  $\beta$ NF-Einwirkung, Proben mit je 0,1  $\mu$ g gRNA).

<i><b>Probe</b></i>	<i><b>Signal</b></i>	<i><b>Log Signal</b></i>
1	31997,0	4,51
2	31665,0	4,50
3	29997,0	4,48
4	28400,0	4,45
5	30446,0	4,48
6	26685,0	4,43
$\bar{x}$	<b>29865,0</b>	<b>4,48</b>
$\pm s$	<b>2019,9</b>	<b>3,31</b>

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Die Optimierung der RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in Leberpräzisionsschnitten als Induktionsnachweis

Die in der Literatur (Hodgson et al. 1993) beschriebene PCR-Methode wurde für den Induktionsnachweis des CYP1A1 in LS nach deren mehrstündiger  $\beta$ NF-Einwirkung (in vitro) angepaßt. Präzisionsschnitte männlicher Ratten (40 d) wurden 24 h in vitro mit  $\beta$ NF behandelt. Die Isolierung und die RT wurden wie beschrieben abgehandelt. Eine  $\beta$ -Actin-mRNA-PCR wurde zur Überprüfung der RT und PCR durchgeführt (Abbildung 3-6).

Neben den einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes und deren Einfluß auf das PCR-Produkt wurde außerdem die Zahl der Zyklen für die Vervielfältigung der cDNA variiert. Jeder Teilabschnitt beginnt mit der Auflistung des aus der Literatur entnommenen PCR-Ansatzes.

#### 4.1.1. Magnesiumchlorid-Konzentrataion

Zu optimierender Ansatz:

<i>Parameter (Ausgangskonzentration)</i>	<i>Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.</i>
Reaktionspuffer	
Tris-HCl,	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH=8,55)	1,6 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>1,5 mM</b>
dNTP Mix (25mM je dNTP)	0,2 mM
CYP1A1-Primer up	0,4 $\mu$ M
CYP1A1-Primer down	0,4 $\mu$ M
Taq-Polymerase	80 u/ml
cDNA	2,0 $\mu$ l (= 100 ng gRNA)

Bei der Untersuchung des Einflusses der Magnesiumchlorid-Konzentration im 25 µl PCR-Ansatz (0,25 mM bis 8,0 mM, n=3) zur CYP1A1-mRNA-PCR zeigt sich ein Maximum an PCR-Produkts bei 2,0 mM (Tabelle 4-1). Kleinere und größere MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen führen zu einer Abnahme des Produkts (Diagramm 4-1). Mit Verwendung von 0,25 und 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> pro Ansatz konnte kein Ergebnis gezeigt werden (Abbildung 4-1).

Abbildung 4-1: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS:  
Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration (0,25 mM bis 8,0 mM).

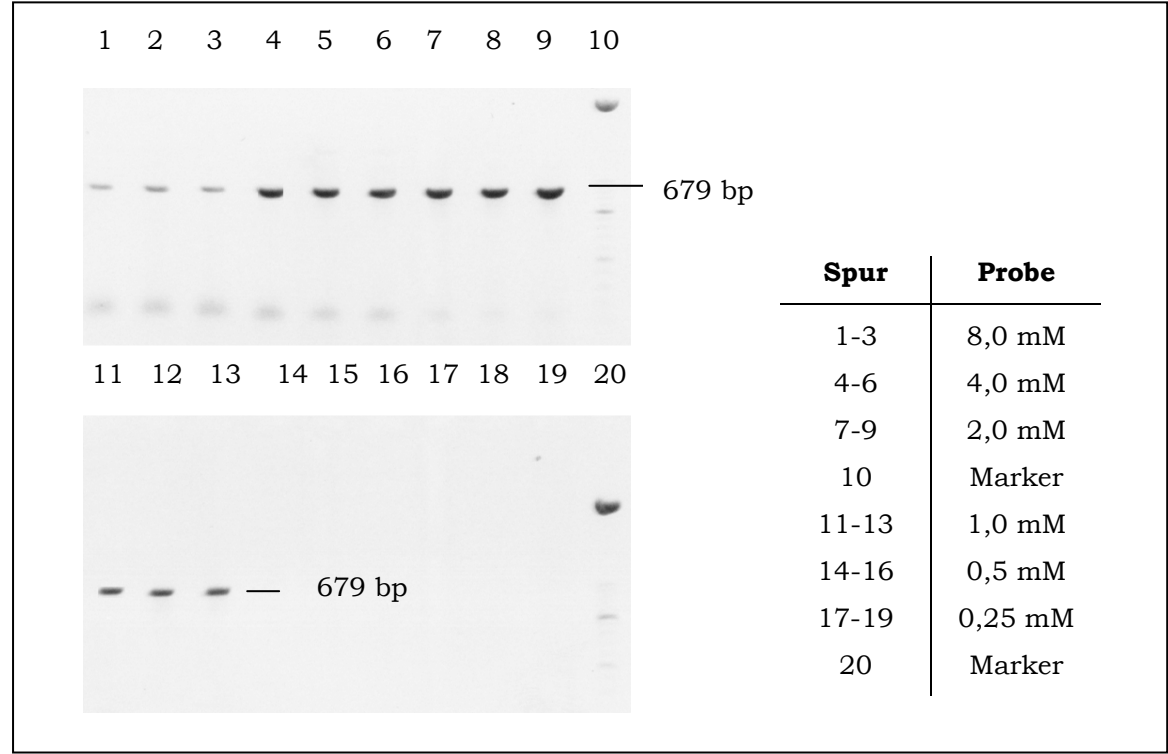
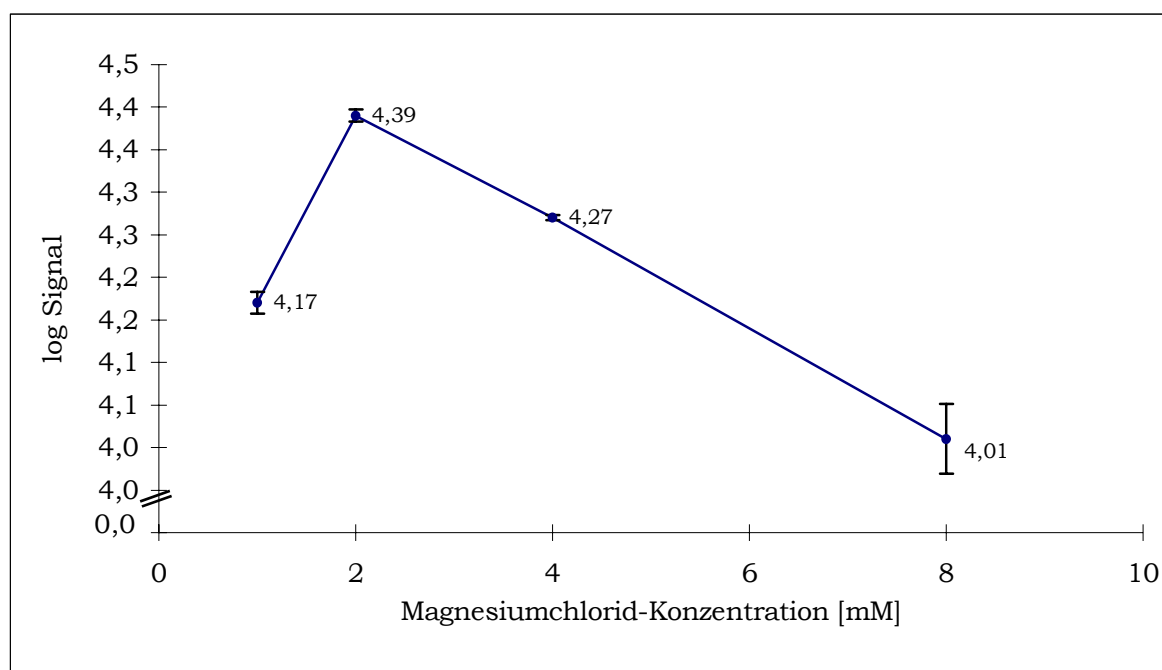


Tabelle 4-1: Wertetabelle zu Abbildung 4-1. n=3.

MgCl <sub>2</sub> [mM]	log Signal ( $\xi$ )	S <sub>log Signal</sub>
0,25		
0,50		
1,00	4,17	0,013
2,00	4,39	0,007
4,00	4,27	0,003
8,00	4,01	0,041

Diagramm 4-1: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration (0,25 mM bis 8,0 mM).  
(Werte in Tabelle 4-1).



### 4.1.2. Template-Konzentration

Zu optimierender Ansatz:

<i>Parameter (Ausgangskonzentration)</i>	<i>Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.</i>
Reaktionspuffer	
Tris-HCl,	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH=8,55)	1,6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP Mix (25mM je dNTP)	0,2 mM
CYP1A1-Primer up	0,4 µM
CYP1A1-Primer down	0,4 µM
Taq-Polymerase	80 u/ml
<b>Template (cDNA)</b>	<b>2,0 µl (=100 ng gRNA)</b>

Für die Bestimmung der Template-Konzentration wurde cDNA mit 0,78 bis 200 ng gRNA pro 25 µl PCR-Ansatz untersucht (Tabelle 4-2).

Abbildung 4-2: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Template-Konzentration (12,5 bis 200 ng gRNA).

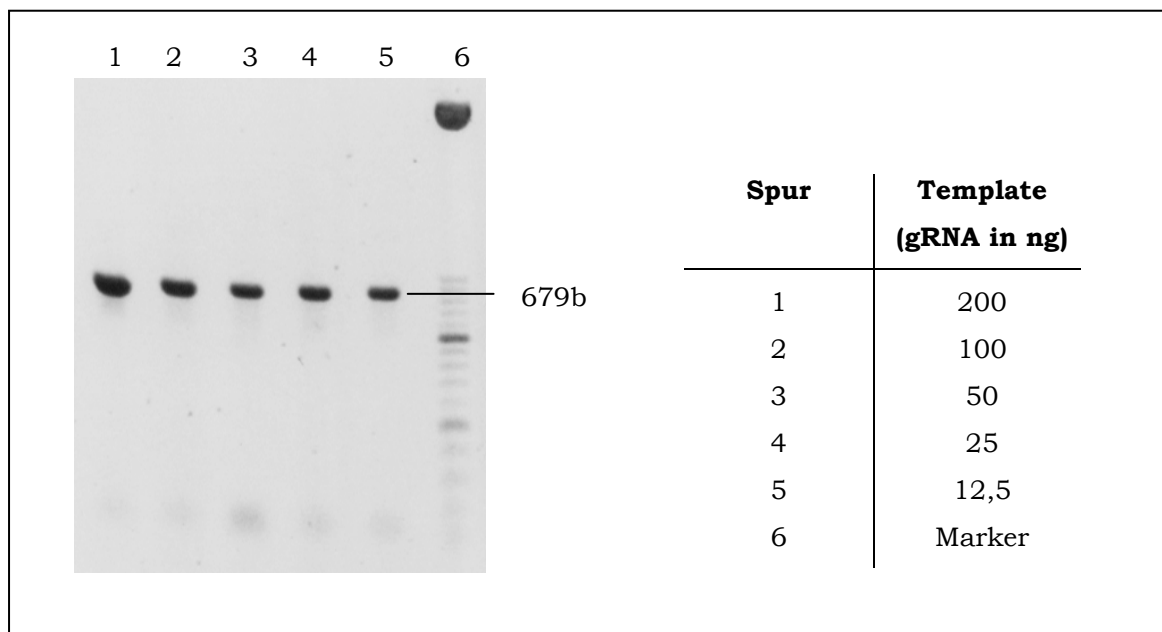


Abbildung 4-3: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Template-Konzentration (0,78 bis 12,5 ng gRNA).

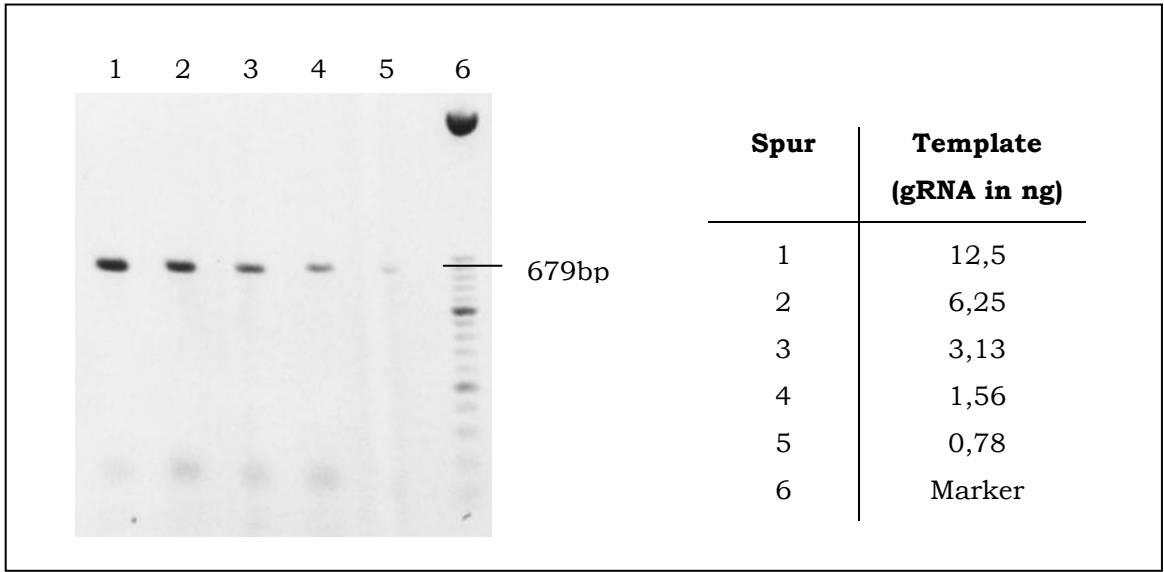
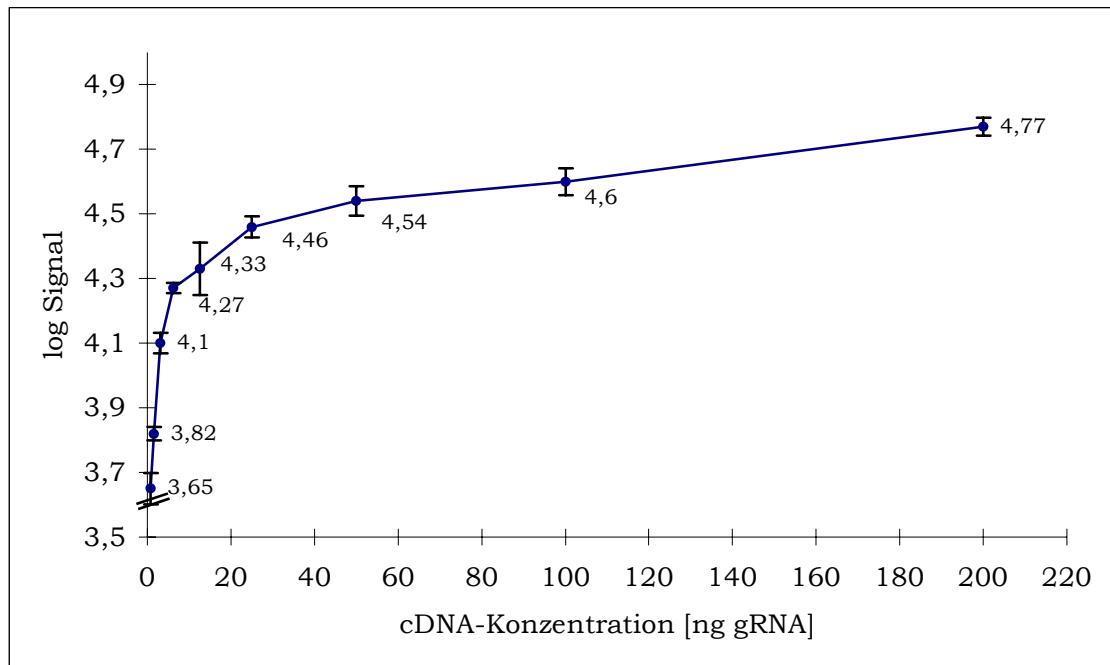


Tabelle 4-2: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Template-Konzentration (0,78 bis 200 ng gRNA).Wertetabelle. VDS-Auswertung der Elektropherogramme in Abbildung 4-2 und 4-3. n=4.

CgRNA (ng)	log Signal (ξ)	S log Signal
0,78	3,65	0,048
1,56	3,82	0,021
3,13	4,10	0,032
6,25	4,27	0,016
12,5	4,33	0,081
25	4,46	0,033
50	4,54	0,045
100	4,60	0,041
200	4,77	0,027



Diagramm 4-2: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der cDNA-Konzentration im Reaktionsansatz (0,78 bis 200 ng gRNA). Werte in Tabelle 4-2.



Eine Linearität ist bis zu einer gRNA-Menge von 6,25 ng im Reaktionsansatz zu erkennen. Bei höheren Template-Konzentrationen ist der Anstieg der Kurve geringer, was zum Teil durch den progredienten Verbrauch einiger Komponenten im Ansatz bedingt wird. Die densitometrische Auswertung kann diesen Kurvenverlauf unterstützen. Die cDNA mit 12,5 bzw. 25 ng gRNA zeigte nach ihrer Amplifikation bereits sehr kräftige Banden.

4.1.3. Primer-Konzentration

Zu optimierender Ansatz:

<i>Parameter (Ausgangskonzentration)</i>	<i>Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.</i>
Reaktionspuffer	
Tris-HCl,	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH=8,55)	1,6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP Mix (25mM je dNTP)	0,2 mM
<b>CYP1A1-Primer up</b>	<b>0,4 µM</b>
<b>CYP1A1-Primer down</b>	<b>0,4 µM</b>
Taq-Polymerase	80 u/ml
cDNA	2,0 µl (=100 ng gRNA)

Die CYP1A1-PCR wurde mit Primer-Konzentrationen von 0,2 bis 1 µM je Primer durchgeführt (Abbildung 4-4). Das größte PCR-Produkt ergab sich bei einer Primer-Konzentration von 0,8 µM.

Abbildung 4-4: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Primer-Konzentration im Reaktionsansatz (0,2 bis 1,0 µM).

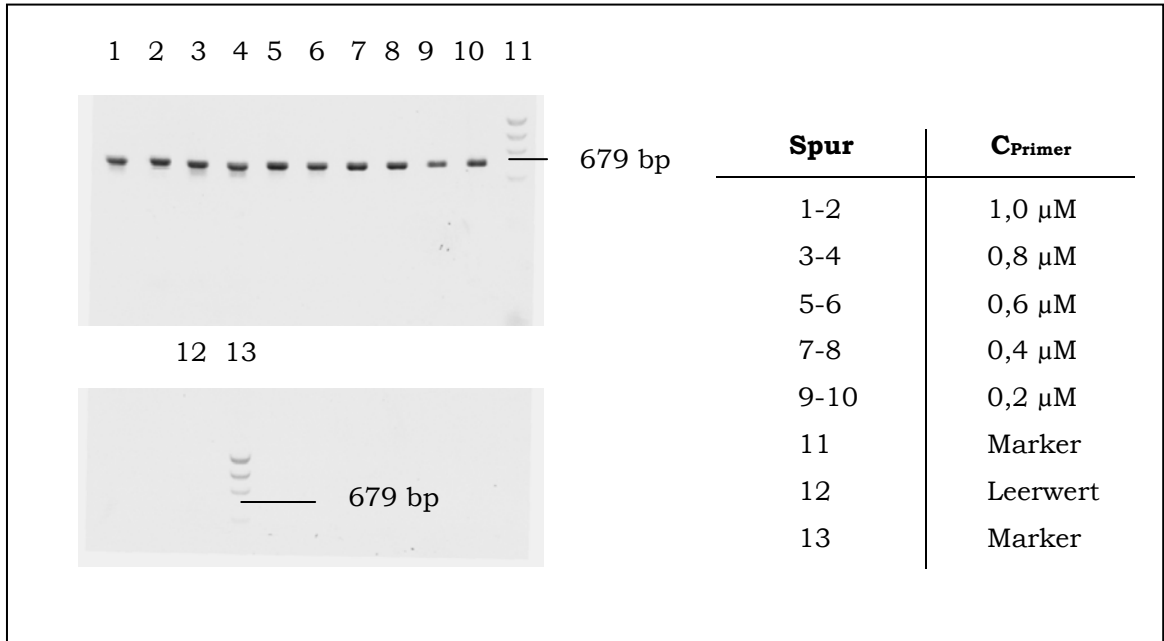
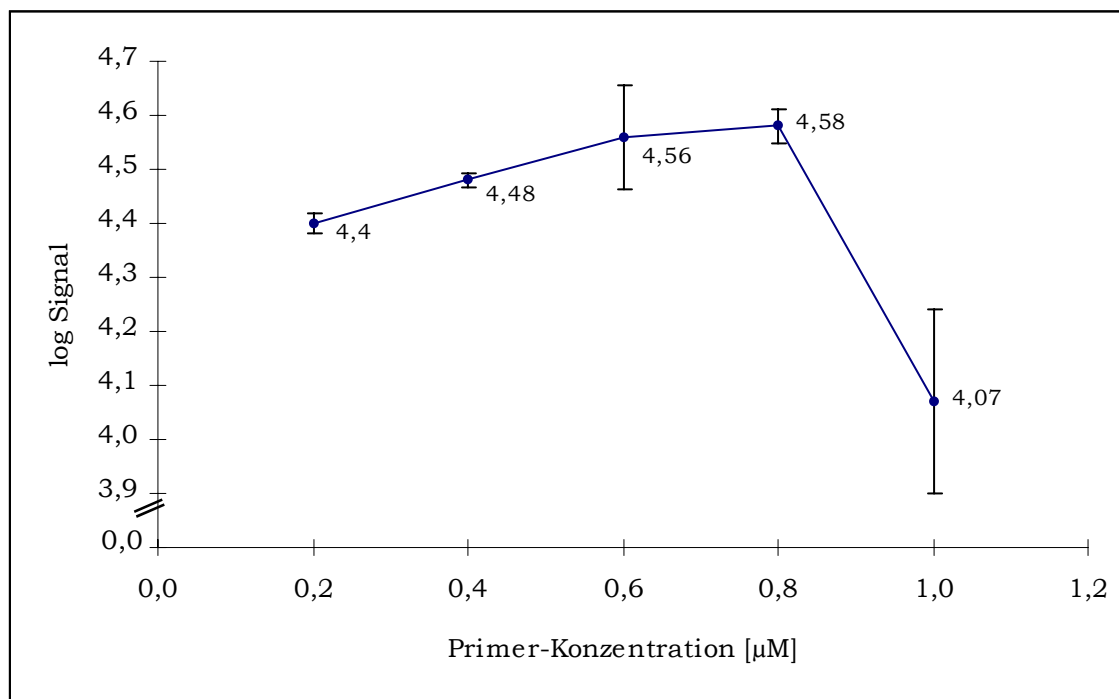


Tabelle 4-3: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Primer-Konzentration im Reaktionsansatz (0,2 bis 1,0  $\mu\text{M}$ ). Wertetabelle zu Abbildung 4-4. n=2.

$C_{\text{Primer}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	log Signal ( $\xi$ )	S <sub>log Signal</sub>
0,2	4,40	0,018
0,4	4,48	0,014
0,6	4,56	0,096
0,8	4,58*	0,030
1,0	4,07	0,170

Diagramm 4-3: RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1-mRNA in LS: Optimierung der Primer-Konzentration im Reaktionsansatz (0,2 bis 1,0  $\mu\text{M}$ ). Werte in Tabelle 4-3.



4.1.4. Zyklenzahl zur Vervielfältigung der CYP1A1-mRNA

Es wurde der Einfluß der Zyklenzahl (Z) auf die Amplifikation der CYP1A1-mRNA untersucht. Dazu wurde der in seiner Zusammensetzung optimierte PCR-Ansatz (siehe 4.1. ff.) und cDNA mit je 50 ng gRNA  $\beta$ NF-behandelter Präzisionsleberschnitte verwendet. Die cDNA wurde mit 7 bis 52 Zyklen vervielfältigt. Lagen die Meßwerte bei der VDS-Auswertung außerhalb des ermittelten linearen Meßbereiches (Abbildung 4-6, Spur 15-22), wurden die Proben entsprechend mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und erneut gemessen.

Die Werte der Tabelle 4-4 geben die *errechneten* Ergebnisse wieder. Das Diagramm 4-4 zeigt zusammenfassend die Beziehung zwischen Produktmenge und Zyklenzahl.

Abbildung 4-5: Untersuchung des Einflusses der Zyklenzahl (Z) auf die Amplifikation der CYP1A1-cDNA. PCR mit optimierten PCR-Ansatz. Z= 7-25. Leerwert ohne RNA.

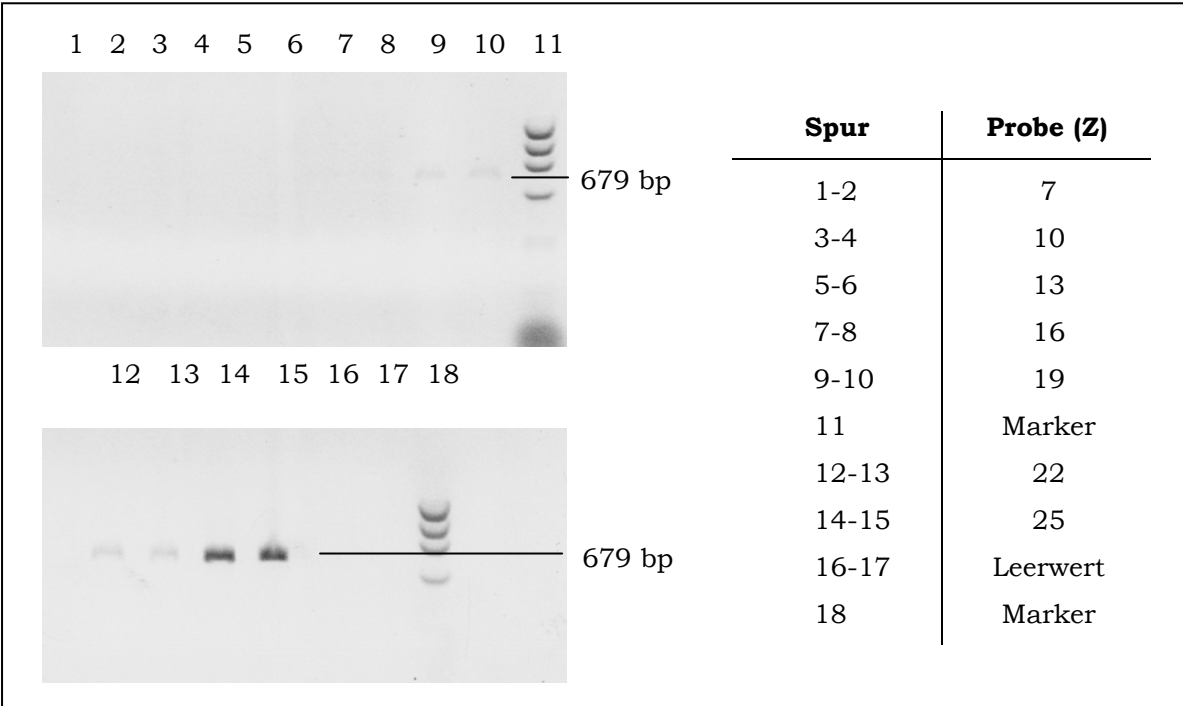


Abbildung 4-6: Untersuchung des Einflusses der Zyklenzahl (Z) auf die Amplifikation der CYP1A1-cDNA. PCR mit optimierten PCR-Ansatz. Z= 10-52.

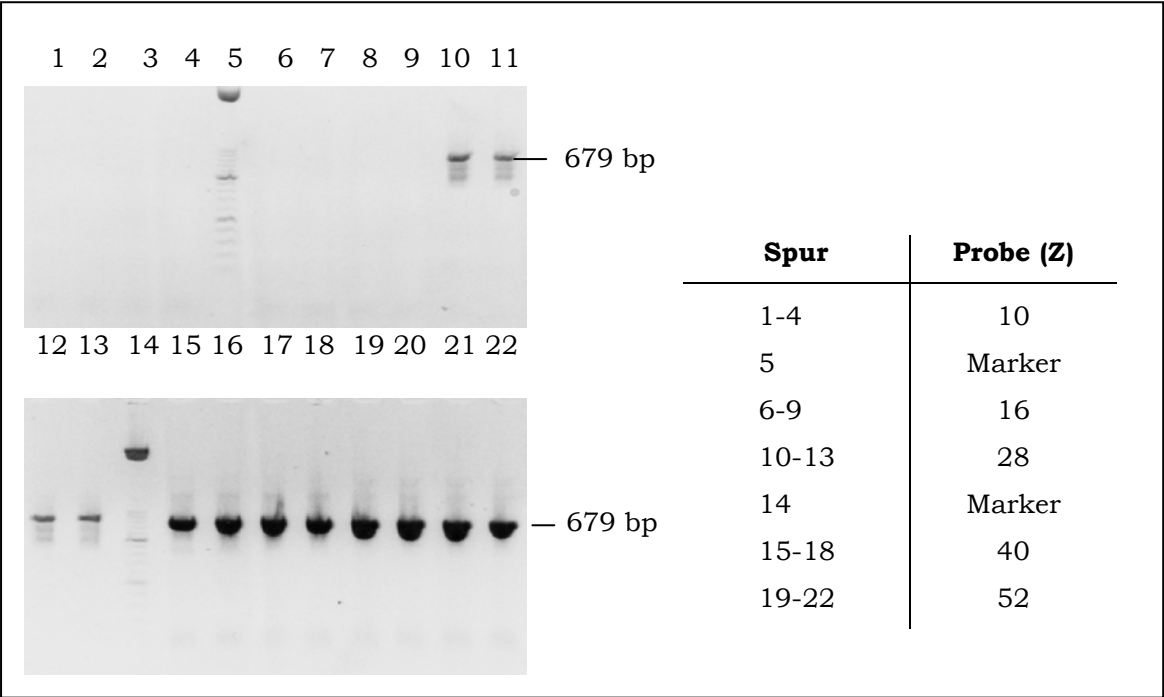
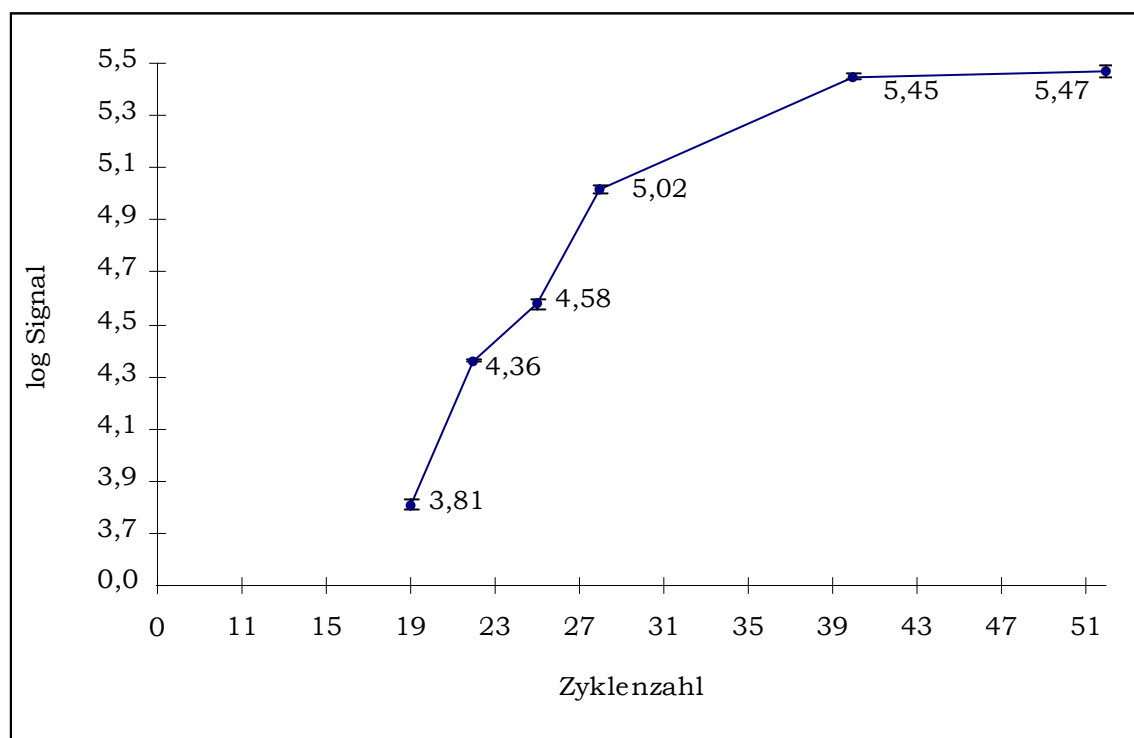


Tabelle 4-4: VDS-Auswertung zu Abbildung 4-5 und 4-6. Untersuchung des Einflusses der Zyklenzahl (Z) auf die Amplifikation der CYP1A1-mRNA, Z= 7-52. <sup>(1)</sup>n= 2, <sup>(2)</sup>n=4.

Z	log Signal (ξ)	S log Signal
7 <sup>(1)</sup>		
10 <sup>(2)</sup>		
13 <sup>(1)</sup>		
16 <sup>(2)</sup>		
19 <sup>(1)</sup>	3,81	0,016
22 <sup>(1)</sup>	4,36	0,005
25 <sup>(1)</sup>	4,58	0,019
28 <sup>(2)</sup>	5,02	0,016
40 <sup>(2)</sup>	5,45	0,009
52 <sup>(2)</sup>	5,47	0,026

Diagramm 4-4: Bestimmung des Einflusses der Zyklenzahl (Z=7-52) auf die Ausbeute der CYP1A1-PCR (Werte in Tabelle 4-4). Darstellung der Logarithmen der Signalwerte.



Aus den Voruntersuchungen 4.1.1. bis 4.1.4. ergibt sich folgender optimierter PCR-Ansatz:

Parameter	Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.
Reaktionspuffer (pH=8,55)	
Tris-HCl	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,6 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>2 mM</b>
dNTP Mix	0,2 mM (je dNTP)
<b>CYP1A1-Primer up</b>	<b>0,8 µM</b>
<b>CYP1A1-Primer down</b>	<b>0,8 µM</b>
Taq-Polymerase	80 u/ml
<b>Template</b>	1 µl (50 ng gRNA)

#### 4.1.4. Ölbeschichtung und Heizdeckel

Bei der Inkubation der Proben im Thermocycler für die Amplifikation der cDNA kam es häufig zu einer Kondensatbildung in den Reaktionsgefäßen (V= 0,5 ml). Dies führte zu inhomogenen PCR-Ergebnissen bei identischen Proben (Abbildung 4-7, 4-8).

Aus diesem Grunde beschichteten wir die Proben mit Mineralöl und verwendeten einen Thermocycler mit beheizbarem Deckel (T=110°C). So konnte der genannte negative Effekt minimiert werden.

In Abbildung 4-7 sind die Proben in Spur 1-5 ohne, in Spur 7-11 mit Öl im Thermocycler amplifiziert.

Abbildung 4-7: Intraindividuelle Unterschieden identischer Proben  $\beta$ NF-induzierter LS nach RT-PCR. Ein Benetzen der Proben (7-11) mit Mineralöl und die Verwendung eines Thermocyclers mit Heiz-deckel führen zu mehr Homogenität der Ergebnisse.

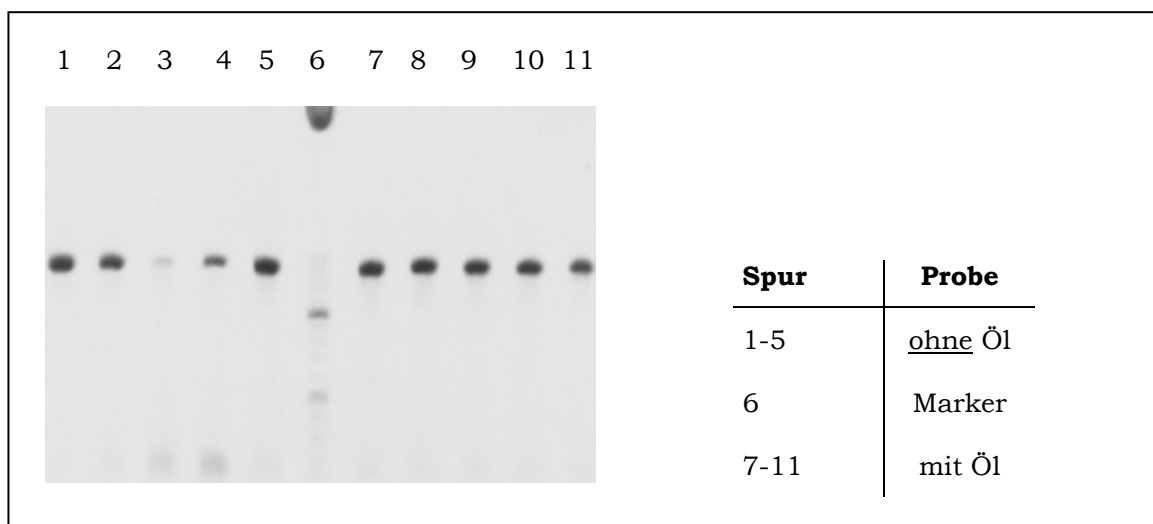
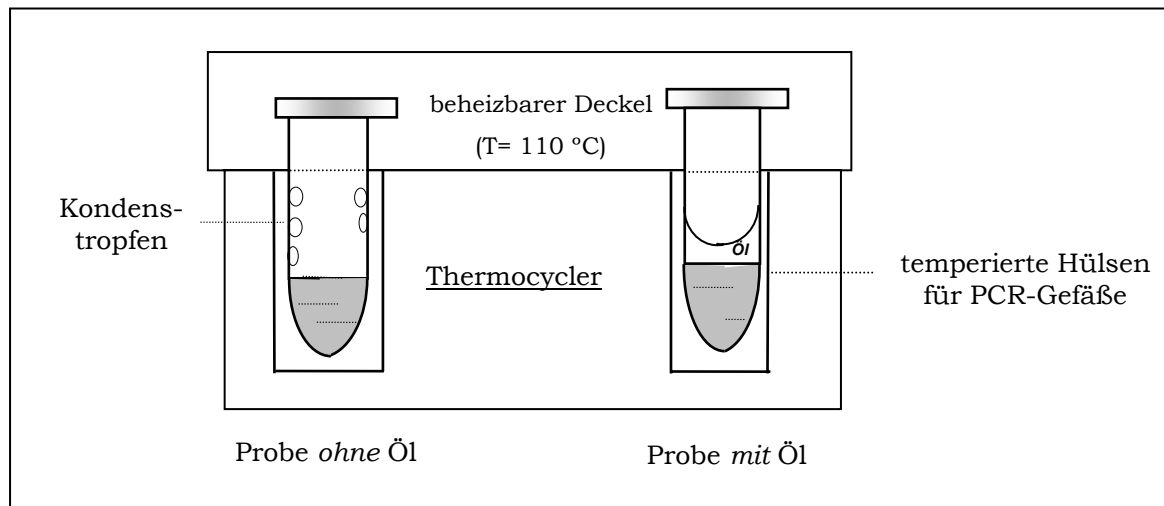


Abbildung 4-8: Ein Benetzen der Proben mit Mineralöl und die Verwendung eines Thermocyclers mit beheizbaren Denkel verhindert in den Probegefäßen die Kondensatbildung. Schema zur Problemerkklärung.





## 4.2. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach verschiedenen Vorbehandlungen

### 4.2.1. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten ohne $\beta$ NF-Einwirkung

In den untersuchten LS-Proben ohne  $\beta$ NF-Einwirkung fand sich eine geringe CYP1A1-mRNA-Konzentration. Dieser genannte Befund fand sich auch bei unbehandelten, nicht geschnittenen Leberproben.

Einige Autoren fanden in unbehandelten LS CYP1A1 (u.a. Lupp et al., 2001).

Zur Klärung möglicher Zusammenhänge wurden Leber und LS mehrerer männlicher Ratten auf CYP1A1-mRNA untersucht.

Die Gegenüberstellung der Befunde in Tabelle 4-5 zeigt, daß der Anteil bei allen untersuchten Kontrollproben bei den LS signifikant größer ist als bei den Proben aus Lebergewebe ( $p=0,0021$ ).

Tabelle 4-5: Proben aus unbehandeltem Leber- und LS-Gewebe. Anteil der untersuchten Kontrolltieren mit CYP1A1-mRNA-Nachweis. P zeigt die Signifikanz im Gruppenvergleich (Erläuterung im Text).

	<b>Alter</b> [d]	<b>n</b>	<b>Absoluter (relativer) Anteil mit CYP1A1- mRNA-Nachweis</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
L	10-42	35	13 (37,1%)	0,0021
LS	10- 43	40	29 (72,5%)	
L-1	10, 11, 13	9	4 (44,4%)	0,7790
LS-1	10, 11, 13	12	12 (100,0%)	
L-2	20, 21, 29	13	5 (38,5 %)	0,0069
LS-2	20, 21, 29	13	7 (53,8%)	
L-3	38, 40, 42	13	4 (30,8 %)	0,0267
LS-3	38, 40, 42,43	15	10 (66,7%)	

Es wurden hierbei je Gewebeart 35 bzw. 40 Tiere untersucht. 72,5 % der genannten LS zeigten CYP1A1-mRNA.

Im Gruppenvergleich der Altersgruppen ist der Anteil positiver Kontrollen bei den Tieren in der Perinatalphase (LS-1) signifikant höher als in den Gruppen mit älteren Ratten LS-2 und LS-3 ( $p = 0,0069$  und  $0,0267$ ).

Bei den Kontrollproben aus Lebergewebe zeigte sich eine Abnahme des Anteils mit CYP1A1-mRNA-Nachweis von 44,4 auf 30,8 %. Dieser Befund ist jedoch als Tendenz zu werten. Er ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

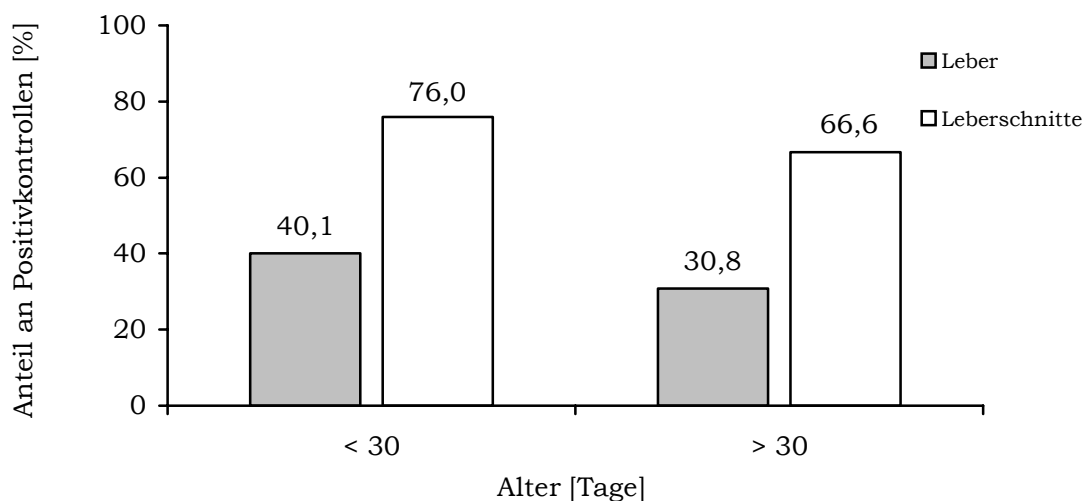
Die Zusammensetzung der Nahrung ist bei den Ratten während der ersten 40 Lebenstage unterschiedlich. Bis zu einem Alter von 30 d werden die Tiere fast ausschließlich durch das Muttertier ernährt. Nach dem Absetzen erhalten die Jungtiere nur noch Trockenfutter (Altromin 1316) und Wasser. Der zusätzliche Faktor der Nahrungsumstellung wurde geprüft, indem alle bisher untersuchten Kontrolltiere in zwei Gruppen zusammengefaßt wurden: Gruppe I < 30 d Gruppe II > 30 d.

Bei dieser Gegenüberstellung zeigt sich sowohl bei den LS, als auch bei den Proben aus Lebergewebe eine Abnahme der Positivkontrollen um ca. 10% (Tabelle 4-6, Diagramm 4-6). Diese Befunde sind jedoch nicht signifikant.

Tabelle 4-6: Anteil der untersuchten Kontrolltieren mit CYP1A1-mRNA-Nachweis unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ernährungsperioden. Tiere unterschiedlichen Alters.

<b>Gruppe</b>	<b>n</b>	<b>Alter</b> [d]	<b>Anteil mit CYP1A1-mRNA-Nachweis</b> [%]
L-1	22	< 30	40,1
L-2	13	> 30	30,8
L-2	25	< 30	76,0
LS-2	15	> 30	66,6

Diagramm 4-6: Anteil der untersuchten Kontrolltieren mit CYP1A1-mRNA-Nachweis mit Berücksichtigung der unterschiedlichen Ernährungsperioden. Tiere unterschiedlichen Alters. Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 4-6.



#### 4.2.2. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition (in vitro)

##### 4.2.2.1. Analyse der CYP1A1-mRNA aus Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Behandlung mit der kompetitiven RT-PCR

Bei den Tieren, deren LS-Proben ohne  $\beta$ NF-Einwirkung einen CYP1A1-mRNA-Nachweis in der RT-PCR zeigten, sollte mit den nachfolgenden Untersuchungen geprüft werden, ob eine durch  $\beta$ NF ausgelöste Induktion quantitativ erfaßt werden kann.

Es wurden LS fünf männlicher Ratten über 6 h mit  $\beta$ NF in vitro behandelt und anschließend auf den CYP1A1-mRNA-Gehalt untersucht. Parallel wurden nochmals Kontroll-LS der selben Tiere ohne  $\beta$ NF-Einwirkung untersucht.

Abbildung 4-9 zeigt exemplarisch das Ergebnis nach CYP1A1-mRNA-PCR mit Verwendung  $\beta$ NF-vorbehandelter LS. Ausgehend von der Eich-RNA-Konzentration bei deren Verdünnung von 1:6400 wurde die molare

Stoffmenge von  $3,47 \times 10^{-17}$  mol CYP1A1-mRNA für die Nativ-mRNA berechnet. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen molaren Massen von Eich- und Nativ-RNA.

Abbildung 4-9: Ergebnis der kompetitiven RT-PCR zur Quantifizierung von 6 h  $\beta$ NF-behandelter LS (männliche Ratte, 40 d). Eine Übereinstimmung der Signale der PCR-Produkte der Nativ-Probe und des Standards konnte bei dessen Verdünnung von 1:6400 (Spur 4) nachgewiesen werden.

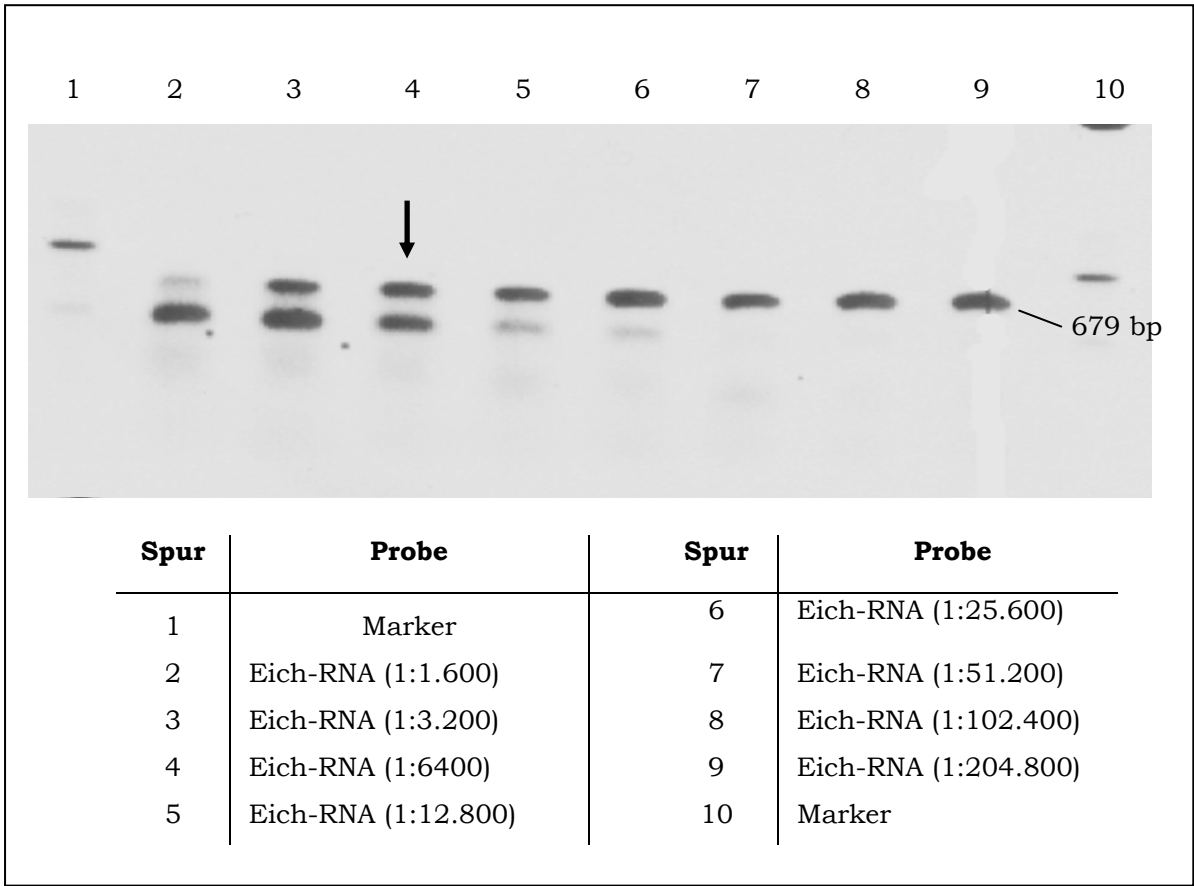
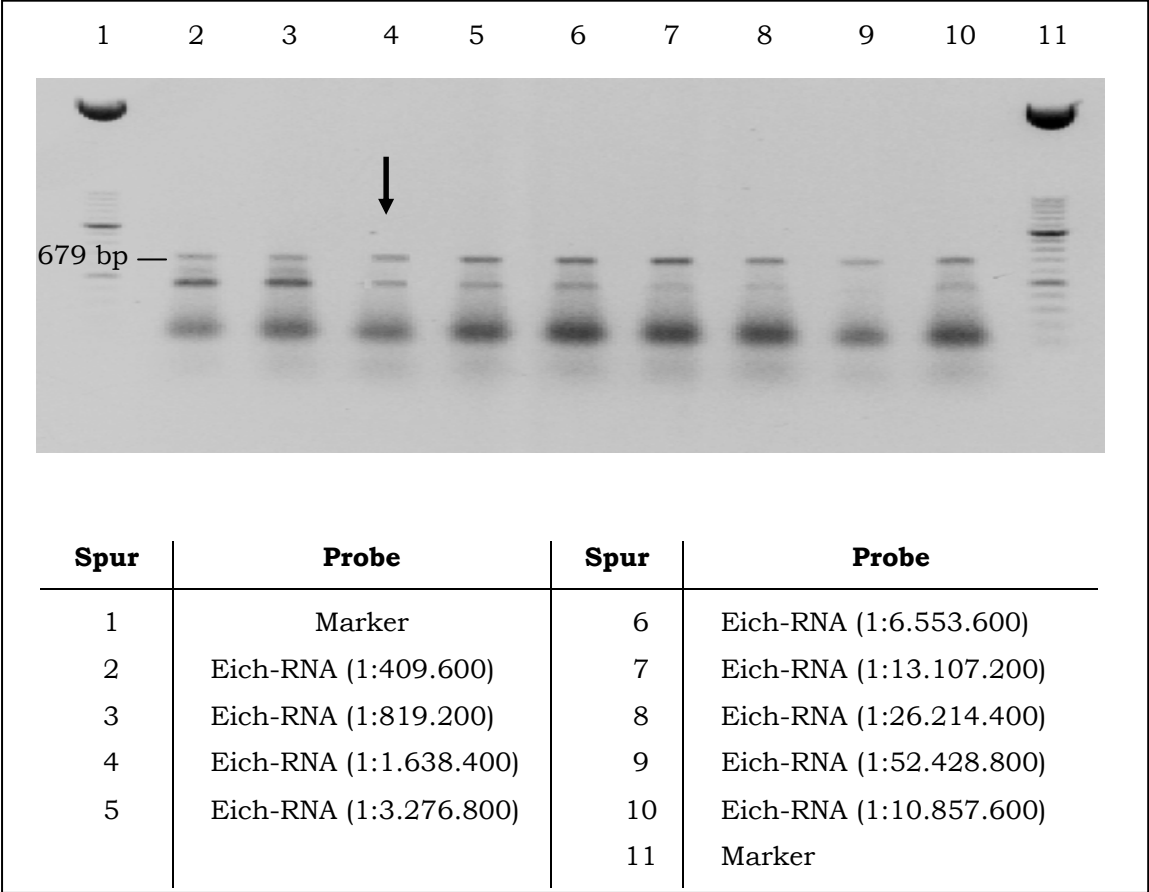


Abbildung 4-10 zeigt ein Beispiel für die unbehandelten LS ohne  $\beta$ NF-Einwirkung. Es fand sich hierbei eine Signalübereinstimmung der PCR-Ergebnisse von Nativ- und Eich-RNA bei 1:1.638.400. Dies ergibt für die Kontrollprobe aus LS ohne  $\beta$ NF-Einwirkung eine molare Stoffmenge von  $0,54 \times 10^{-19}$  mol CYP1A1-mRNA.

Abbildung 4-10: Ergebnis der kompetitiven RT-PCR zur Quantifizierung der CYP1A1-mRNA aus Kontroll-LS (männliche Ratte, 40 d). Eine Übereinstimmung (Pfeil) der Signale der Nativ-Probe und des Standards ist bei dessen Verdünnung von 1: 1.638.400.



Die hergestellten LS weiterer 5 männlicher Ratten wurden z.T. 6 h  $\beta$ NF behandelt (in vitro). Von den gleichen Lebergewebe wurde auch Kontrollproben herstellt und untersucht. Die CYP1A1-mRNA wurde mittels kompetitiver RT-PCR quantitativ bestimmt.

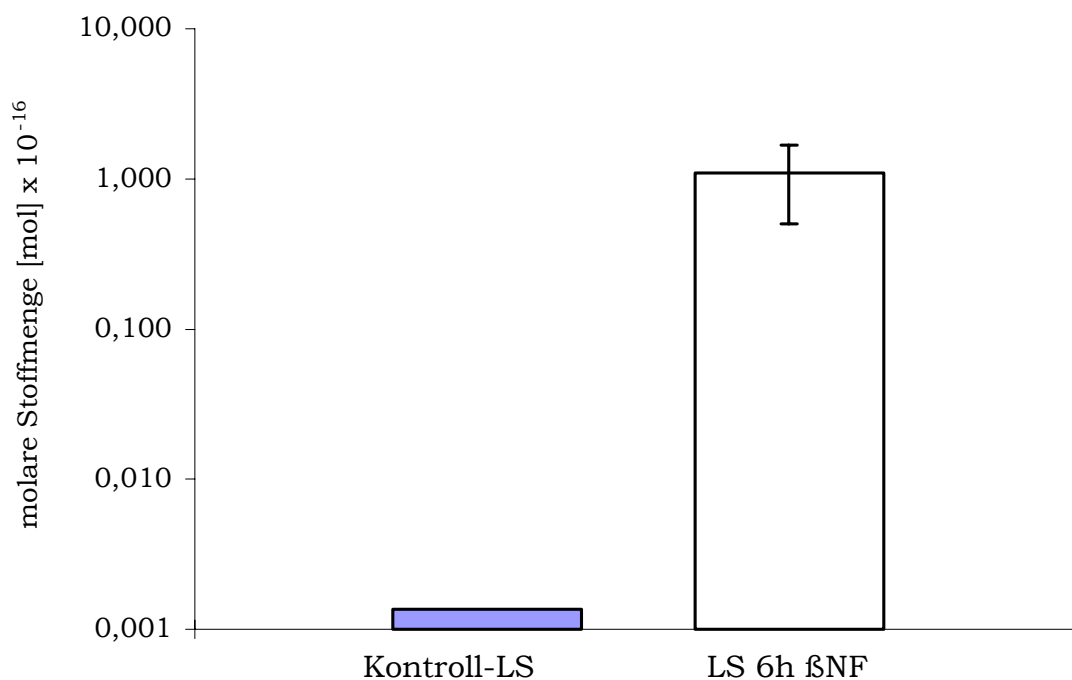
Dabei zeigten die unbehandelten LS der Kontrollen eine CYP1A1-mRNA-Gehalt von maximal  $1,36 \times 10^{-19}$  mol. In den  $\beta$ NF-behandelten LS wurden durchschnittlich  $1,09 \times 10^{-16}$  mol CYP1A1-mRNA nachgewiesen. Tabelle 4-6a zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der fünf untersuchten Ratten.

Es konnte somit der Induktionsnachweis erbracht werden und gezeigt werden, daß die CYP1A1-mRNA-Konzentration in  $\beta$ NF-behandelten LS hochsignifikant größer ist als in den Kontrollen. Dieser Unterschied von etwa 1:1000 ist in Abbildung 4-6a nochmals dargestellt.

Tabelle 4-6a: Ergebnisse nach der kompetitiven RT-PCR zur Quantifizierung der CYP1A1-mRNA. Proben: LS mit 6-stündiger  $\beta$ NF-Einwirkung und Kontroll-LS.

Tier	Probe	Molare Stoffmenge der mRNA (mol)
1	LS 6h $\beta$ NF	$0,35 \times 10^{-16}$
2	LS 6h $\beta$ NF	$0,90 \times 10^{-16}$
3	LS 6h $\beta$ NF	$0,90 \times 10^{-16}$
4	LS 6h $\beta$ NF	$1,40 \times 10^{-16}$
5	LS 6h $\beta$ NF	$1,90 \times 10^{-16}$
	<b><math>\bar{x}</math> (<math>\pm s</math>)</b>	<b><math>1,09 (0,586) \times 10^{-16}</math></b>
1-5	Kontroll-LS	
	<b><math>\bar{x}</math> (<math>\pm s</math>)</b>	<b><math>&lt;1,36 \times 10^{-19}</math></b>

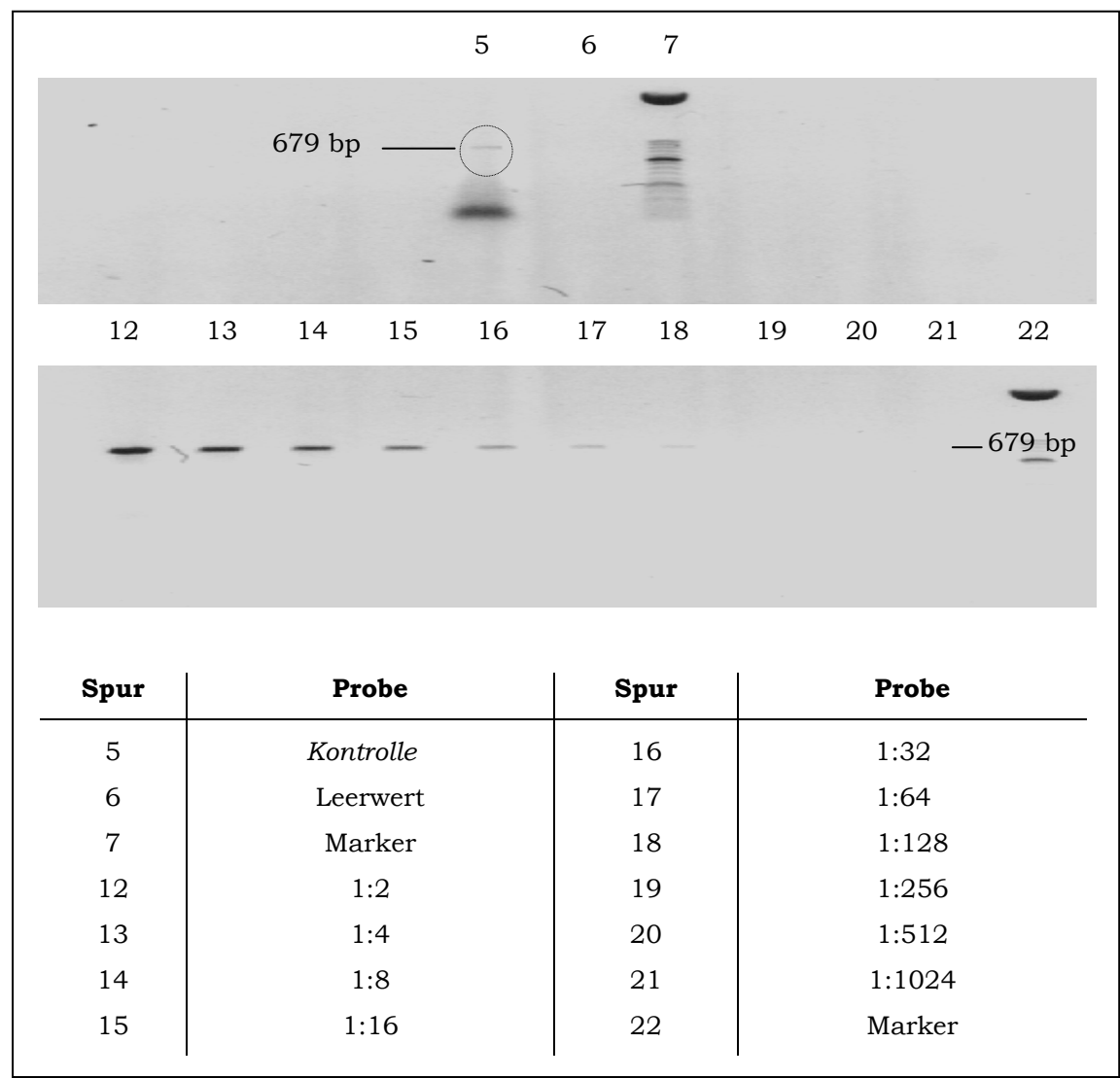
Diagramm 4-6a: Ergebnisse nach der kompetitiven RT-PCR zur Quantifizierung der CYP1A1-mRNA. Proben: LS mit 6-stündiger  $\beta$ NF-Einwirkung und Kontroll-LS. Gegenüberstellung der molaren Stoffmengen aus Tabelle 4.6a.



#### 4.2.2.2. Analyse der CYP1A1-mRNA aus Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon Behandlung mit dem Video-Dokumentationssystem

Die untersuchten Proben entsprechen denen in 4.2.2.1. Das PCR-Produkt der über 6 h mit  $\beta$ NF-behandelten LS wurde für diese Untersuchung mit aqua bidest verdünnt. Nach ihrer Trennung mittels Elektrophorese wurden die Proben mit unterschiedlicher Konzentrationen an CYP1A1-mRNA densitometrisch gemessen. Die resultierenden Signale wurden mit dem Signal der CYP1A1-mRNA des Kontrollgewebes verglichen (Abbildung 4-11).

Abbildung 4-11: Verdünnungen des CYP1A1-PCR-Produktes nach 6-stündiger In-vitro-Behandlung (ßNF) von LS einer 40 d Ratte (Spur 12-22) und die entsprechende unverdünnte Kontrollprobe (Spur 5).



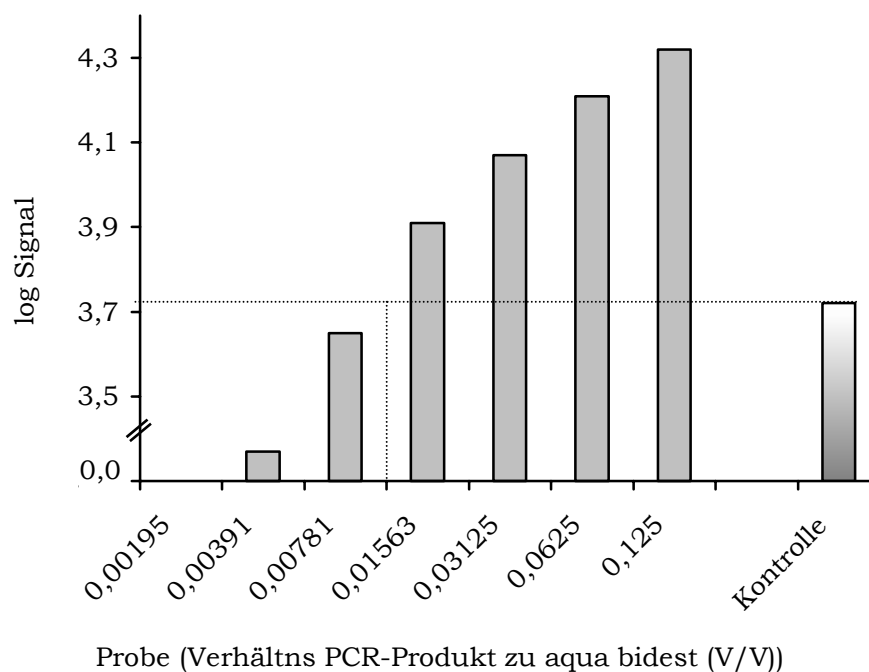
Die Ergebnisse der computergestützten Auswertung zeigt Tabelle 4-7. Ein Vergleich der Kontrollproben mit den ßNF-behandelten LS bzw. deren Verdünnungen ergibt ein Verhältnis von etwa 1:100 (Diagramm 4-7).



Tabelle 4-7: Ergebnis der Analyse mit dem VDS zur Beurteilung des Elektropherogrammes in Abbildung 4-11.

<b>Aufgetragene Probe</b> (Verhältnis PCR-Produkt zu aqua bidest (V/V))	<b>log Signal</b>
0,12500	4,32
0,06250	4,21
0,03125	4,07
0,01563	3,91
0,00781	3,65
0,00391	3,37
0,00195	
0,00098	
<b>Kontrollprobe</b>	
1	3,72

Diagramm 4-7: Darstellung der in Tabelle 4-7 dargestellten Ergebnisse.

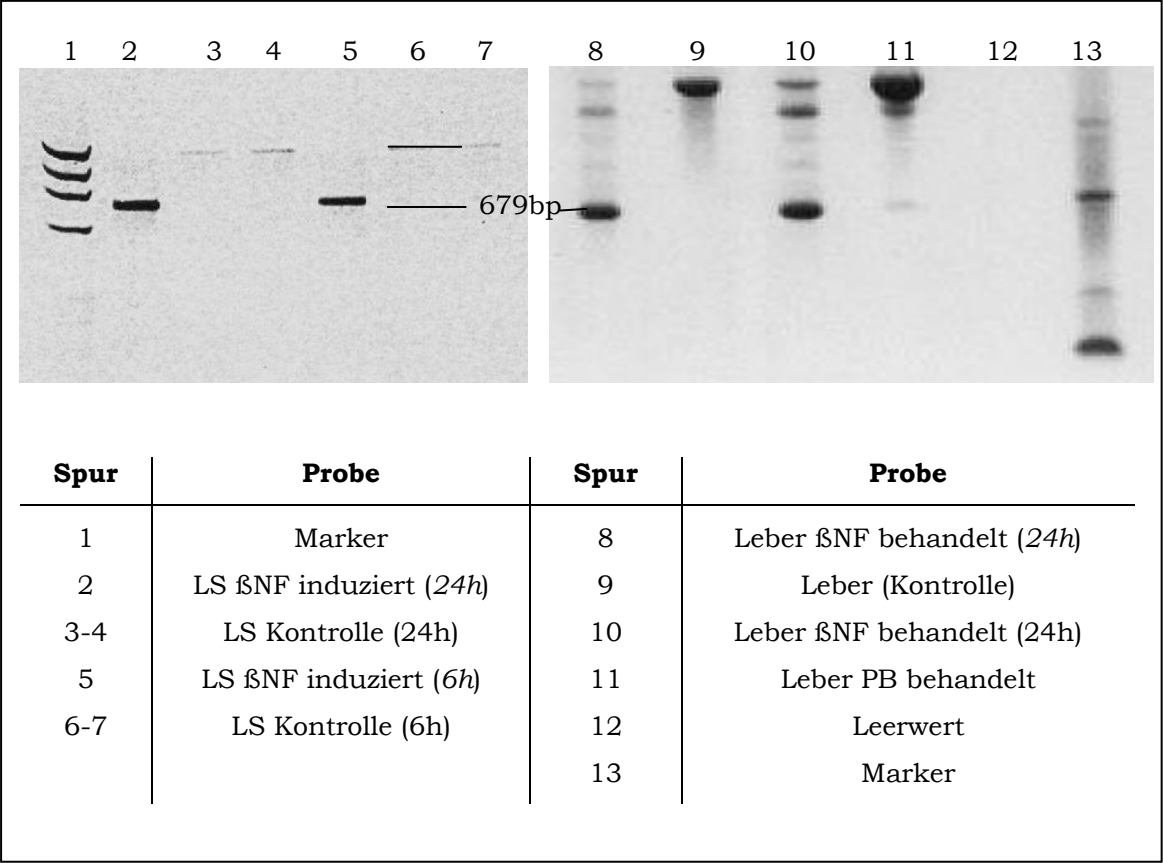


#### **4.2.3. CYP1A1-mRNA in Leberschnitten nach $\beta$ -Naphthoflavon-Exposition sowie nach In-vivo-Vorbehandlung der Tiere mit $\beta$ -Naphthoflavon**

Zunächst sollte nochmals betont werden, daß der Induktionsnachweis von CYP1A1-mRNA in LS mit der RT-PCR möglich ist. Dieser gelingt mit der optimierten Methode bereits nach 6-stündiger  $\beta$ SNF-Einwirkung auf die LS (Abbildung 4-12). Diese nur kurze Behandlungsdauer wurde als wichtiges Ergebnis in den vorangegangenen Abschnitten bereits vorweggenommen. Unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit und der möglichen Denaturierung des CYP im isolierten Organ oder im LS ist diese kurze Behandlungszeit von besonderer Bedeutung.

Zur Beurteilung der biologischen Relevanz der erhobenen Befunde nach In-vitro-Behandlung der LS erfolgte der Versuch, die CYP1A1-mRNA nach In-Vivo-Vorbehandlung der Tiere mit  $\beta$ SNF nachzuweisen. Mit Verwendung der optimierten Methode gelang es, nahezu identische Befunde nach In-vitro- bzw. In-vivo-Einwirkung zu erzielen (Abbildung 4-12).

Abbildung 4-12: PCR zum CYP1A1-Induktionsnachweis: LS nach  $\beta$ NF-Behandlung (6 und 24 h, in vitro). Leberproben nach  $\beta$ NF-Exposition (24 h, in vivo). Spur 11: Leberprobe nach PB-Einwirkung (24 h).



## 5. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde mit Hilfe der PCR mit reverser Transkription die Induktion des CYP am Beispiel von CYP1A1 in Leberpräzisionsschnitten der Ratte, dem In-vitro-Modell der Wahl für Untersuchungen der Biotransformation, geprüft. Die Untersuchungen erfolgten sowohl nach In-vitro-Exposition der LS gegenüber dem Induktor als auch zur Darstellung der biologischen Relevanz nach In-vivo-Vorbehandlung der Ratten. Als Induktor des CYP1A1 wurde  $\beta$ NF verwendet. Dieser wurde bei den In-vitro-Untersuchungen an LS dem Inkubationsmedium über 6 bzw. 24 h zugesetzt. Bei den In-vivo-Versuchen wurde  $\beta$ NF 6 bzw. 24 h vor der Gewebeentnahme intraperitoneal verabreicht.

Die In-vitro-Untersuchungen erfolgten nach der von Müller et al. (Müller et al., 1996, 1998) beschriebenen Methode, bei der die LS unter langsamen Schütteln in einem modifizierten Williams-E-Medium inkubiert werden. Wichtige Parameter als Zeichen der Vitalität der Schnitte (Kalium-, Protein-, DNA- und Gluthationkonzentration), bleiben über einem Zeitraum bis zu 48 h nahezu konstant.

Für die Darstellung von CYP1A1-mRNA aus Leber- und LS-Gewebe mittels RT-PCR mußten die Reaktionsbedingungen an die Fragestellung angepaßt werden. Dazu wurde der Einfluß einiger Komponenten des PCR-Ansatzes (cDNA, Magnesiumchlorid, Primer) auf die Produktbildung geprüft.

(1) Die Template-Konzentration (cDNA) wurde in Abhängigkeit von der Vorbehandlung des Untersuchungsgutes variiert.

Die Amplifikation von 0,25 bzw. 0,5  $\mu$ l cDNA durch die reverse Transkription von 1  $\mu$ g gRNA aus LS (24 h  $\beta$ NF behandelt) zeigt bereits sehr kräftige Banden im Ergebnis der CYP1A1-PCR. Eine Erhöhung der cDNA-Menge bewirkte eine nicht lineare Produktzunahme, was auf eine

geringere Effizienz und abnehmende Ausbeute pro Amplifikationszyklus hinweist.

Bei nur 6-stündiger  $\beta$ NF-Vorbehandlung wurde 1  $\mu$ l (= 0,05  $\mu$ g gRNA) verwendet. Bei LS von unbehandelten Kontrolltieren wurden 2 bis 4  $\mu$ l Template verwendet (= 1,0 bis 2,0  $\mu$ g gRNA).

(2) Die Primer, als Ausgangspunkt für die Vervielfältigung der gesuchten Nukleinsäuresequenz, müssen in der PCR im Überschuß vorliegen. Für die Optimierung der CYP1A1-PCR wurden Reaktionen mit 0,2 bis 1  $\mu$ M je CYP1A1-Primer und Ansatz durchgeführt. Die Auswertung ergab eine maximale Produktbildung mit 0,8  $\mu$ M up- bzw. down-Primer. Dabei wurden keine unspezifischen Produkte beobachtet, was bei zu hohen Primerkonzentrationen nach der RT-PCR beschrieben wird (Nicholl et al., 1995). Dieser Effekt wird mit einer konzentrationsabhängigen Veränderung der Primerstruktur erklärt. Primär nicht benachbarte Molekülabschnitte können so zusammengeführt werden und an einen falschen Nukleinsäureabschnitt binden (Nicholl et al., 1995).

(3) Die Konzentration des Magnesiumchlorides beeinflusst die Spezifität und Ausbeute der RT-PCR erheblich. So birgt ein Überschuß von Magnesiumionen die Gefahr der Synthese nicht spezifischer PCR-Produkte (Nicholl et al., 1995). Für die Bestimmung der optimalen  $MgCl_2$ -Konzentration sind 0,25 bis 8 mM je Ansatz verwendet worden. Die größte Bande wurde bei den Reaktionen mit 2 mM  $MgCl_2$  gemessen. Bei Konzentrationen von 0,25 mM sowie 0,5 mM wurde kein Produkt in der CYP1A1-mRNA-PCR erhalten. Reaktionen mit Verwendung von 4 mM und 8 mM  $MgCl_2$  zeigten eine Abnahme der Produktmenge und Ausbeute.

(4) Des Weiteren wurde der Einfluß der Amplifikationsdauer (Zyklenzahl) der PCR auf die Produktbildung untersucht. Bei weniger als 16 Zyklen war die Menge an gebildetem PCR-Produkt noch so gering, daß es mit der Gelelektrophorese noch nicht nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Erhöhung der Zyklenzahl führte zu einer Produktzunahme, so daß nach 52 Zyklen das größte Signal in der Messung resultierte.

Allerdings erwiesen sich unter den gewählten Bedingungen 40 Zyklen für diesen PCR-Ansatz als optimal, denn der Signalanstieg von 40 auf 52 Zyklen beträgt nur ca. 6 %. Offensichtlich befindet sich die Produktbildung bei 52 Reaktionszyklen bereits in der Stationärphase.

(5) Als vorteilhaft hat sich die Mineralöl-Überschichtung für die PCR bei der von uns verwendeten technischen Ausrüstung erwiesen. Durch die Verwendung des Öls konnte eine Kondensatbildung im Reaktionsgefäß verhindert werden. Dies verbesserte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Mit der für unsere Untersuchungsbedingungen optimierten RT-PCR gelang es, die CYP1A1-mRNA nach 6- und 24- stündiger  $\beta$ NF-Einwirkung in LS erfolgreich nachzuweisen und somit den CYP1A1-Induktionsnachweis zu erbringen.

Dieses Ergebnis ist von enormer Relevanz. Der Nachweis der CYP-Induktion mit anderen Methoden zur Bestimmung der CYP-Konzentration oder der Monooxygenaseaktivität (z.B. PROD) macht lange Inkubationszeiten von bis zu 72 h notwendig (Lake et al., 1993, 1996, 1997; Glöckner u. Müller 1995; Müller et al., 1996). Dieser Umstand ist häufig mit einem Verlust an CYP und dessen Biotransformationsaktivität verbunden. Das erklärt, daß bei langen Inkubationszeiten oftmals die Induktion de facto nicht oder nicht eindeutig nachgewiesen wird. Bei kurzer Vorbehandlung der LS spielt die Entdifferenzierung der Hepatozyten mit Verlust von bestimmten CYP-Formen bzw. der Konzentrationszunahme von CYP1A1, das physiologisch überwiegend *extrahepatisch* auftritt eine geringere Rolle (Müller et al., 1998).

Der Induktionsnachweis durch die Bestimmung der CYP-mRNA mittels RT-PCR findet auf der Ebene der Transkription, also einem frühen Zeitpunkt der Genexpression, statt. Dadurch begründet sich zusätzlich das hohe Maß an Empfindlichkeit dieser Methode. Vergleicht man die Ergebnisse einer aktuellen Arbeit, in der die CYP2B1-Induktion in LS nach PB-Behandlung mittels RT-PCR und an Hand der Änderung der

Monooxygenaseaktivität (PROD) untersucht wurde, zeigt sich, daß mit der RT-PCR ein 10- bzw. 60-facher Anstieg der CYP2B1-mRNA nach 6- bzw. 24-stündiger PB-Behandlung der LS nachgewiesen werden konnte. Bei der Bestimmung der Enzymaktivität von CYP2B1 mittels PROD fand sich eine 4-fache Steigerung nach 24-stündiger PB-Behandlung der Schnitte (Müller et al., 2000).

Mit der optimierten RT-PCR gelang der Induktionnachweis von CYP1A1 auch nach In-vivo-Behandlung der Ratten mit  $\beta$ NF. Die erhobenen Befunde unter In-vitro- und In-vivo-Bedingungen erwiesen sich als qualitativ gleichwertig. Dieses Ergebnis spricht für die von uns optimierte Methode und ist eine weitere Bestätigung dafür, daß LS ein Untersuchungsmodell darstellen, das den In-vivo-Bedingungen nahe kommt.

Mit der erwähnten höheren Empfindlichkeit wächst die Bedeutung von bis dahin irrelevant geglaubter Störfaktoren, die z.B. auf das Inkubationssystem wirken, und einen nachweisbaren Einfluß auf das CYP haben könnten.

Bei der Zusammenstellung unserer Befunde fanden sich bei Kontrolltieren sowohl im Leber- als auch im Leberschnittgewebe Proben mit nachgewiesener CYP1A1-mRNA, obgleich lt. vorhandener Literatur CYP1A1 bei Ratten primär nicht vorhanden sein soll, sondern erst nach Induktion nachweisbar ist (Schenkman et al., 1989). Andere Autoren konnten jedoch CYP1A1 ebenfalls bei unbehandelten Jungtieren nachweisen (Lupp et al., 1998, 2001, Glöckner et al., 2001).

Eine Gegenüberstellung der Befunde untersuchter Kontrollproben aus Leber und LS-Gewebe zeigte, daß sowohl in Leber als auch Leberschnitten CYP1A1-mRNA nachweisbar ist. Als Ursache für den CYP1A1-mRNA-Nachweis vor allem in Kontrollgewebe von LS wird eine gewisse Entdifferenzierung der Leberzellen im Schnitt und damit verbunden eine Zunahme der CYP1A1-Konzentration gesehen. Im Gegensatz zu isolierten Hepatozyten, wo CYP1A1-mRNA bereits nach 1 Stunde gebildet wird,

spielt die genannte Entdifferenzierung in Leberpräzisionsschnitten scheinbar eine weniger gewichtige Rolle (Müller et al., 1998).

Bei den untersuchten LS unbehandelter Kontrolltiere ist der Anteil mit CYP1A1-Nachweis signifikant größer als bei den Proben aus Lebergewebe ( $p=0,0021$ ). 72,5 % der genannten LS zeigten CYP1A1-mRNA.

Der Schneidevorgang bei der Herstellung der Leberschnitte und der damit verbundenen „Streß“ für den Zellverband wird als weitere Einflußgröße auf die vermehrte CYP1A1-mRNA-Bildung in LS im Vergleich zu den Leberproben diskutiert.

Die verwendeten Tiere waren unterschiedlichen Alters, so daß ein Altersgang als möglicher Einflußfaktor auf den Gehalt an CYP1A1 in Leber- und LS-Gewebe geprüft werden konnte.

Thomas et al. (Thomas et al., 1981) beschrieb einen Abfall des relativen Anteils positiver Proben bei dem von ihm untersuchten Lebergewebe. Er fand, daß der Anteil von CYP1A1 in unbehandelten Tieren im Laufe der Reifung von 4% auf 1% fällt. Auch Blank et al. zeigten bei Untersuchungen der hypophysären Regulation und dem CYP-vermittelten Metabolismus von Steroiden und Medikamenten alters- und geschlechtsbedingte Veränderungen des CYP (Tabelle 5-1). Es konnte nachgewiesen werden, daß das gesamte CYP in den Lebermikrosomen präpubertärer, unbehandelter Jungtiere (21 d) signifikant höher war als das gleichartiger erwachsenen Ratten (56 d).

Tabelle 5-1: Alters- und geschlechtsbedingte CYP-Veränderungen unbehandelter Ratten (Blank et al. 1986). n=20.

<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (d)</b>	<b>CYP (in mol/mg Protein)</b>
♂	21	$0,92 \pm 0,11$
♂	56	$0,76 \pm 0,06$
♀	21	$1,8 \pm 0,13$
♀	56	$0,59 \pm 0,08$



Für die Darstellung einer Abhängigkeit der erhobenen Befunde vom Alter der Tiere wurden insgesamt 40 männliche Ratten untersucht und drei Altersgruppen gebildet. Die erste Gruppe beinhaltete Tiere der Perinatalphase (bis 13 d), die zweite Jungtiere der Phase der Nahrungsumstellung, auf die unten näher eingegangen wird (20-29 d), die dritte Gruppen umfaßte ältere Tiere (38 bis 43 d).

Bei den untersuchten LS zeigte sich im Vergleich der Altersgruppen, daß der Anteil positiver Kontrollen bei den Tieren in der Perinatalphase signifikant größer ist als bei *allen* älteren Ratten ( $p = 0,0069$  und  $0,0267$ ). In dieser Gruppe wiesen alle 12 Tiere CYP1A1-mRNA auf.

Beim Lebergewebe konnte durch den Vergleich der Altersgruppen eine Abnahme der „positiven Kontrollen“ von 44,4 % auf 30,8 % gezeigt werden. Dieser Befund ist jedoch als Tendenz zu werten. Er ist nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Der in der Literatur (siehe oben) beschriebene altersbedingte Rückgang von CYP1A1 kann zusammenfassend für Leber und LS bestätigt werden. Er ist jedoch nur bei den LS statistisch signifikant und von einem besonders hohen Anteil bei den Tieren in der Perinatalphase charakterisiert.

In der Literatur wird erwähnt, daß eine kohlenhydratarme und eiweißreiche Diät einen Anstieg des Cytochroms P450 bewirken kann (Markwart et al., 1990). Steigt die Menge an Gesamt-Cytochrom P450-Enzyme unter dieser Diät, so ist zu erwarten, daß davon auch CYP1A1 betroffen ist. Die von uns verwendeten HAN-Wistar-Ratten (10 bis 43 d) erhielten anfangs nahezu ausschließlich Muttermilch. Am 30. Lebenstag wurden die Jungtiere von dem Muttertier abgesetzt. Von diesem Zeitpunkt an erhielten die Tiere ausschließlich Trockenfutter (Altromin® 1316) und Wasser.

Die chemische und physikalische Zusammensetzung der Muttermilch ist abhängig von der Tierart und von der Rasse. Einen Überblick über die Milchzusammensetzung gibt Tabelle 5.2. wieder, in der auch die Zusammensetzung des genannten Trockenfutters aufgeführt ist.

Tabelle 5-2: Ausgewählte Parameter der Milch verschiedener Säugetiere und des Trockenfutters (lt. Hersteller), Angaben in Prozent.

<b>Art</b>	<b>Fett</b>	<b>Lactat</b>	<b>Protein</b>	<b>Asche</b>
Ratte <sup>(1)</sup>	15	3	12	2
Rind <sup>(1)</sup>	3,6	4,8	3,5	0,7
Mensch <sup>(1)</sup>	3,5	7		
Altromin® <sup>(2)</sup>	5	-	22,5	6,5

<sup>(1)</sup> Scheunert und Trautmann (1987)

<sup>(2)</sup> Produktbeilage des Herstellers

Inwieweit die Ernährung der Tiere, die in der Perinatalphase durch die Muttermilch bestimmt ist, eine beeinflussende Größe auf die Bildung des CYP1A1 gerade zu diesem Zeitpunkt ist, bleibt offen.

Darüber hinaus können lt. Literaturangaben folgende Faktoren verstärkend auf die CYP-Expression wirken:

- Genetischer Polymorphismus (Allel-Varianten, Mutationen)
- Hormonelle Regulation (z.B. STH, TSH, FSH, LH, PTH und ACTH sowie Insulin) und entwicklungsbedingte hormonelle Änderungen (Schenkman et al., 1989; Imaoka et al., 1991)
- Veränderungen bei Erkrankungen des Organismus: durch Infektionen, Inzucht und durch Schadstoffbelastungen (Desinfektions-, Löse-, Schädlingsbekämpfungsmittel u.a.). Diabetes mellitus, Hypertension, Hungerzustand (Schenkman et al., 1989; Imaoka et al., 1990).

Infektionskrankheiten bei den Versuchstieren konnte auf Grund der Haltungsprotokolle von den zuständigen Mitarbeitern weitgehend ausgeschlossen werden.

Auch geschlechtsbedingte Unterschiede werden in zahlreichen Literaturquellen besonders betont. In den ersten Tagen, der Neonatalphase, bestimmen testikuläre Androgene und Wachstumshormone die Expression der CYP-Enzyme die Metabolisierung einiger Medikamente und Steroide (Eden et al., 1979; Kato et al., 1982; Gustaffson et al., 1983; Waxman et al., 1985; Blank et al., 1986).

Einige CYP-Isoenzyme kommen geschlechtsspezifisch vor (Halpert et al., 1988; Cooper et al., 1993). Andere CYP hingegen findet man, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägt, bei beiden Geschlechtern, so z.B. *CYP1A1*, *CYP1A2* und *CYP2C7* (Kamataki et al., 1983; Bandiera et al., 1986).

Um eventuelle geschlechtsbedingte Unterschiede ausschließen zu können, verwendeten wir ausschließlich männliche Tiere.

Entsprechend der ausgewiesenen Befunde ist in der Versuchstierpopulation (vor allem in der Perinatalphase) mit einem hohen Anteil von Tieren zu rechnen, die bereits unter Kontrollbedingungen *CYP1A1*-mRNA bilden. Somit war die Frage zu klären, ob sich bei diesen Bedingungen mit Hilfe der RT-PCR eine Induktion des *CYP1A1* eindeutig nachweisen läßt.

Dafür wurden LS 40 d alter Tiere gewonnen und über 24 h in Gegenwart von  $\beta$ -NF inkubiert. Die Kontrollschnitte besaßen Spuren von *CYP1A1*-mRNA. In der Elektrophorese stellte sich ein Produkt nach der PCR dar. Die mit  $\beta$ NF behandelten Schnitte zeigten - wie zu erwarten- ein viel deutlicheres Ergebnis nach RT-PCR. Beide Befunde wurden quantitativ ausgewertet und verglichen. Dieser Quantifizierung erfolgte nach zwei Methoden.

- (1) Mit der kompetitiven RT-PCR gelang es, ein Verhältnis der *CYP1A1*-Menge zwischen Kontrolle und Induktion von 1:1000 zu ermitteln.
- (2) Mit der herkömmlichen RT-PCR und der sich anschließenden Auswertung mit einem Video-Dokumentations-System wurde ein Verhältnis von ca. 1:100 festgestellt.

Die mit beiden Methoden erhobenen Ergebnisse sind quantitativ nur bedingt vergleichbar, da es sich hierbei um zwei im Prinzip völlig unterschiedliche Verfahren handelt. Zudem setzt sich die Quantifizierung mittels konventioneller RT-PCR aus zwei Methoden zusammen, der RT-PCR und dem densitometrisch analysierenden VDS. Dadurch erhöht sich leider die Gefahr des Fehlers.

Der Vorteil der kompetitiven RT-PCR besteht vor allem darin, daß sich Eich- und Proben-RNA im selben Reaktionsansatz befinden und von allen möglichen Störfaktoren bei der Versuchsdurchführung gleichermaßen betroffen werden. Nachteilig erweist sich jedoch der hohe Arbeits- und Zeitaufwand bei seiner Durchführung.

Demgegenüber bedarf es für die Gelscananalyse mittels VDS außer den apparativ-technischen Voraussetzungen wie Hard- und Software keiner weiteren Aufwendungen. Das nach der Elektrophorese vorhandene Elektropherogramm kann bei Bedarf sofort weiter untersucht werden.

Welches der beiden Untersuchungsprinzipien zu favorisieren ist, entscheiden im Wesentlichen Inhalt, Umfang und Zielstellung der Untersuchung. Für die exakte Bestimmung der Induktionsfaktoren ist sicher die kompetitive RT-PCR zu favorisieren. Für ein Screening oder bei Versuchsreihen, bei denen regelmäßig positive Kontrollen zu erwarten sind, würde eine Auswertung mit dem VDS zu bevorzugen sein, da diese Methode bei hinreichender Genauigkeit erheblich weniger zeit- und arbeitsintensiv ist.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Induktion des Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) der Leber durch  $\beta$ -Naphthoflavon ( $\beta$ NF) auf der Ebene der Transkription der Genexpression nachgewiesen werden. Als Versuchstiere dienten männliche HAN-Wistar-Ratten im Alter von 11 bis 43 d. Die Untersuchungen wurden an LS in vitro sowie im Lebergewebe (ex vivo) durchgeführt. Die CYP1A1-mRNA wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkription (RT-PCR) quantitativ dargestellt.

Die Einzelschritte der Methode bestehen aus

- Isolation von DNA-freier Gesamt- RNA aus LS bzw. Lebergewebe, ihrer Quantifizierung und Prüfung auf Reinheit,
- RT,
- PCR,
- Elektrophorese und
- qualitativer und quantitativer Auswertung der Elektropherogramme.

Zur Untersuchung der CYP1A1-mRNA mußten zuerst die Reaktionsbedingungen der RT-PCR angepaßt und optimiert werden. Dazu wurde der Einfluß einiger wichtig erscheinender Komponenten des PCR-Ansatzes (Konzentrationen von Template, CYP1A1-Primer und Magnesiumchlorid) auf die Produktbildung untersucht.

Als optimal erwies sich dabei folgender PCR-Ansatz:

<b>Parameter</b>	<b>Endkonzentration in nukleasefreiem aqua bidest.</b>
Reaktionspuffer (pH=8,55)	
Tris-HCl	2 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,6 mM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>2 mM</b>
dNTP Mix	0,2 mM (je dNTP)
<b>CYP1A1-Primer up</b>	<b>0,8 µM</b>
<b>CYP1A1-Primer down</b>	<b>0,8 µM</b>
Taq-Polymerase	80 u/ml
<b>Template</b>	1 µl (50 ng gRNA)

Bei der Untersuchung von Kontrollgewebe wurden 2 bis 4 µl Template (=100 bis 200 ng gRNA) verwendet.

Weiterhin wurde die zyklenweise ablaufende Vervielfältigung der CYP1A1-cDNA untersucht. Eine Mindestzyklenzahl von 16 war Voraussetzung für ein nachweisbares Produkt im Ergebnis der CYP1A1-PCR. Die Produktbildung stieg bis zu 30 Zyklen nahezu linear an, über 40 Zyklen nahm sie kaum noch zu.

Als vorteilhaft hatte sich zudem das Benetzen des PCR-Ansatzes im Reaktionsgefäß mit Mineralöl erwiesen. Dadurch wurde eine Kondensatbildung der Probe im Thermocycler vermieden und damit intraindividuelle Unterschiede im Meßergebnis auf ein Minimum reduziert.

Die Analyse der Elektropherogramme erfolgte mit einem Video-Dokumentationssystem (VDS), dessen Meßbereich in einer Voruntersuchung bestimmt wurde. Reproduzierbarkeit und Genauigkeit

der quantitativen Bestimmung (Elektrophorese und VDS) wurden ermittelt. Der mittlere Fehler der Methode betrug dabei 6,76 % (n=6).

Mit dieser optimierten RT-PCR gelang der Induktionsnachweis durch die Bestimmung der CYP1A1-mRNA bereits nach 6-stündiger Inkubation der Schnitte in  $\beta$ NF-haltigem Williams-Medium E ( $\beta$ NF gelöst in DMSO, Endkonzentrationen: 2,5 mM  $\beta$ NF und 0,1 % DMSO).

Diese kurze In-vitro-Behandlung ist von großer Bedeutung hinsichtlich der Entdifferenzierung der Leberzellen und der Änderungen im Spektrum der CYP-Formen.

Mit dieser Methode konnte die CYP1A1-mRNA auch im Lebergewebe der Ratte nachgewiesen werden. Für diesen CYP1A1-mRNA-Nachweis wurden 24 d vor Dekapitation der Ratten einmalig 50 mg  $\beta$ NF pro kg Körpergewicht (gelöst in Sonnenblumen-Öl lt. Serva®, Heidelberg) intraperitoneal injiziert.

Bei den Untersuchungen wurde ein in der Literatur kontrovers diskutiertes Phänomen beobachtet - das Auftreten von CYP1A1 bei Kontrolltieren. CYP1A1 wird häufig in der Literatur als nicht konstitutiv, sondern erst nach Induktion nachweisbar beschrieben. Andere Autoren fanden CYP1A1 jedoch auch bei unbehandelten Ratten. Letzteres wird durch unsere Befunde von 40 untersuchten Ratten bestätigt.

Dieses Phänomen wurde in erster Linie auf eine Abhängigkeit vom Alter geprüft. Weitere Einfluß- oder Störfaktoren, wie die Ernährung werden im Diskussionsteil betrachtet.

Auch wenn mittels optimierter RT-PCR eine deutliche Zunahme der CYP1A1-mRNA nach  $\beta$ NF-Behandlung des Lebergewebes im Vergleich zu den Kontrollen zu sehen war, waren wir an einer Möglichkeit interessiert, den sichtbaren Unterschied quantifizieren zu können.

Dafür wurden LS 40 d alter Tiere gewonnen und über 24 h  $\beta$ NF behandelt. Diese Proben zeigten - wie zu erwarten- einen deutlichen

CYP1A1-mRNA-Nachweis nach der RT-PCR. Da auch die Kontrollen Spuren von CYP1A1-mRNA besaßen, wurde auch hier ein Produkt nach der PCR erzielt. Die jeweiligen Befunde sollten quantifiziert und in Relation gesetzt werden. Diese Quantifizierung erfolgte mit zwei Methoden.

- (1) Mit der kompetitiven RT-PCR gelang es ein Verhältnis (Induktion versus Kontrolle) von etwa 1:1000 zu ermitteln.
- (2) Mit der herkömmlichen RT-PCR und der sich anschließenden Auswertung mit einem Video-Dokumentationssystem wurde ein Verhältnis von ca. 1:100 festgestellt.

Ein Vorteil der kompetitiven RT-PCR ist vor allem, daß Eich- und Nativ-RNA in einem Ansatz sind und von allen möglichen Einflußfaktoren gleichermaßen beeinflußt werden. Nachteilig erweist sich jedoch eine aufwendigere und zeitintensivere Durchführung.

Demgegenüber bedarf es für die Gelscananalyse außer den technischen Voraussetzungen, also Hard- und Software, keiner weiteren Aufwendungen. Das nach der Elektrophorese vorhandene Elektropherogramm kann bei Bedarf sofort weiter untersucht werden. Es eignet sich besonders bei Untersuchungen bzw. Screenen großer Probenmengen.



## 7. LITERATUR

(alphabetisch geordnet)

1. Aström A, De Pierre JW. Rat liver microsomal cytochrome P450: purification, characterisation, multiplicity and induction. *Biochem Biophys Acta* 1986; 853: 1-27
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons; New York 1987.
3. Bandiera S, Ryan DE, Levin W, Thomas PE. Age- and sex-related expression of cytochromes p450f and P450g in rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1986 Aug 1; 248(2): 658-76.
4. Barr J, Weir AJ, Brendel K, Sipes IG. Liver slices in dynamic organ culture. II. An in vitro cellular technique for the study of integrated drug metabolism using human tissue. *Xenobiotica* 1991 Mar; 21(3): 341-50.
5. Bast A: *Biotransformation: species differences and determining factors*. *Toxicology Principles and Applications*. CRC Press Boca raton Newe York London Tokyo 1996: 66-91.
6. Birnbaum LS. Age-related changes in carcinogen metabolism. *J Am Geriatr Soc*. 1987 Jan; 35(1): 51-60.
7. Birnbaum LS. Age-related changes in sensitivity to environmental chemicals. *Eisei Kagaku*. 1990; 6: 461-479.
8. Birnbaum LS. Pharmacokinetic basis of age-related changes in sensitivity to toxicants. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1991; 31: 101-28.
9. Black SD, Coon MJ. P-450 cytochromes: structure and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1987; 60: 35-87.
10. Black SD, Coon MJ. Studies on the identity of the heme-binding cysteinyl residue in rabbit liver microsomal cytochrome P-450 isozyme 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985 Apr 16; 128(1): 82-9.

11. Black SD. Membrane topology of the mammalian P450 cytochromes. *FASEB J* 1992 Jan 6; 6(2): 680-5.
12. Blank A, Astrom A, Hansson T, De Pierre JW, Gustafsson JA. Pituitary regulation of cytochrome P-450-mediated metabolism of steroids and xenobiotics in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*. 1986 Apr; 7(4): 575-82.
13. Blankson EA, Chenery RJ, Paine AJ. Cytochrome P450 maintenance and diazepam metabolism in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1991 Aug 22; 42(6): 1241-5
14. Blauboer BM. Biotransformation: detoxification and bioactivation. *Toxicology Principles and Application*. CRC Press Boca Raton New York London Tokyo 1996: 40-65.
15. Brodie BB, Gillette JR. (Eds.). *Concepts in Biochemical Pharmacology*. 1 and 2 in: *Handb. Exper. Pharmacol.*, Vol. 28/1 and 2. Springer; Berlin 1973.
16. Cholerton S, Daly AK, Idle JR. The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci*. 1992 Dec; 13(12): 434-9.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr; 162(1): 156-9.
18. Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ. (eds.). *Advances in Electrophoresis*, Volume 1. VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim 1987.
19. Clark MA, Bing BA, Gottschall PE, Williams JF. Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 1995 Jan 6; 49(1): 97-104.
20. Clark MA, Bing BB, Gottschall PE, Williams JF. Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-MC induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: 97-104.

21. Cooper KO, Reik LM, Jayyosi Z, Bandiera S, Kelley M, Ryan DE, Daniel R, McCluskey SA, Levin W, Thomas PE. Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Mar; 301(2): 345-54.
22. Daujat M, Clair P, Astier C, Fabre I, Pineau T, Yerle M, Gellin J, Maurel P. Induction, regulation and messenger half-life of cytochromes P450 IA1, IA2 and IIIA6 in primary cultures of rabbit hepatocytes. CYP 1A1, 1A2 and 3A6 chromosome location in the rabbit and evidence that post-transcriptional control of gene IA2 does not involve mRNA stabilization. *Eur J Biochem* 1991 Sep 1; 200(2): 501-10.
23. Dean WL, Gray RD. Relationship between state of aggregation and catalytic activity for cytochrome P-450LM2 and NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem*. 1982 Dec 25; 257(24): 14679-85.
24. Denis M, Cuthill S, Wikstrom AC, Poellinger L, Gustafsson JA. Association of the dioxin receptor with the Mr 90, 000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Sep 15; 155(2): 801-7
25. Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem* 1988 Nov 25; 263(33): 17221-4
26. Eden S. Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 1979 Aug; 105(2): 555-60.
27. Edwards RJ, Murray BP, Singleton AM, Boobis AR. Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 1991 Jan 8; 30(1): 71-6.
28. Ehling TE, Thomson DC, Fourman GL, Curtis JF, Hughes MF. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990; 30: 1-45.
29. Ekins S. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 1996 Nov; 28(4): 591-623

30. Fichtl B, Fülgraff G, Neumann HG, Wollenberg P, Forth W, Henschler D, Rummel W. Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Hrsg.: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K). Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxfordn 1996; 7: 3-102.
31. Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. Trends Genet 1993 Nov; 9(11): 380-5.
32. Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawajiri K, Sogawa K, Muramatsu M. Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 May; 79(9): 2793-7.
33. Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Yamane M, Fujii-Kuriyama. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. Nucleic Acids Res 1987 May 26; 15(10): 4179-91.
34. Funae Y, Imaoka S. Multiple forms of cytochrome p450 from microsomes of rat liver, kidney and lung resolved by HPLC. Biochem Int 1985; 11: 523-531.
35. Glasel JA, Deutscher MP. Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research. Academic Press; New York 1995.
36. Glöckner R, Rost M, Pissowotzki K, Müller D. Monooxygenation, conjugation and other functions in cryopreserved rat liver slices until 24 h after thawing. Toxicology. 2001 Mar 21;161(1-2):103-9.
37. Glöckner R, Steinmetzer P, Drobner C, Müller D. Application of cryopreserved precision-cut liver slices in pharmacotoxicology-principles, literature data and own investigations with special reference to CYP1A1-mRNA induction. Exp Toxicol Pathol 1998 Sep; 50(4-6): 440-9.
38. Gonzales FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. Trends in Pharmacological Sciences. 1992; 13: 346-352.

39. Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Evolution, structure, and gene regulation of cytochrome P450. in: Ruckpaul K, Rein H (eds.) *Frontiers in biotransformation*, vol. 1. Akademie, Berlin. 1989: 195-243.
40. Grossman L, Modave K. *Methods in Enzymology*, Vol. 65: Nucleic Acids. Academic Press; New York 1980.
41. Gustafsson JA, Ingelman-Sunberg M. Regulation and substrate specificity of a steroid sulfate-specific hydroxylase system in female rat liver microsomes. *J Biol Chem*. 1975 May 10; 250(9): 3451-8.
42. Gustafsson JA, Mode A, Norstedt G, Skett P. Sex steroid induced changes in hepatic enzymes. *Annu Rev Physiol*. 1983; 45: 51-60.
43. Halpert JR. Multiplicity of steroid-inducible cytochromes P-450 in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1988 May 15; 263(1): 59-68.
44. Hawkins DR. (Ed.). *Biotransformations Vol. 1: A Survey of the Biotransformations of Drugs and Chemicals in Animals*. Royal Society of Chemistry; London 1988.
45. Hines RN. Molecular mechanism controlling CYP 1A gene expression. *Frontiers in Biotransformation*. 1994; 9: 85-110.
46. Hodgson AV, White TB, White JW, Strobel HW. Expression analysis of the mixed function oxidase system in rat brain by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Biochem* 1993 Mar 24; 120(2): 171-9.
47. Horbach GJ, Van Asten JG, Rietjens IM, Kremers P, Van Bezooijen CF. The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P-450. *Xenobiotica* 1992 May; 22(5): 515-22.
48. Horbach GJ. The effect of age on inducibility of various types of rat liver cytochrome P450, *Xenobiotica*. 1992; 22: 515-522.
49. Hui Bon Hoa G, Di Primo C, Dondaine I, Sligar SG, Gunsalus IC, Douzou P. Conformational changes of cytochromes P-450cam and P-450lin induced by high pressure. *Biochemistry*. 1989 Jan 24; 28(2): 651-6.

50. Jansson I. Post-translational modification of cytochrome P450. in: Handb. of Exper. Pharmacol., Vol. 105. Springer; Berlin, Heidelberg 1993.
51. Kamataki T, Maeda K, Yamazoe Y, Nagai T, Kato R. Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats. Arch Biochem Biophys 1983 Sep; 225(2): 758-70.
52. Kato R, Kamataki T. Cytochrome P-450 as a determinant of sex difference of drug metabolism in the rat. Xenobiotica 1982 Nov; 12(11): 787-800
53. Kaufmann FC. (Ed.). Conjugation-deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity in: Handb. of Exper. Pharmacol., Vol. 112. Springer; Berlin, Heidelberg 1994.
54. Kemper B. Mammalian cytochrome P450 genes. Frontiers in Biotransformation 1993; 8: 1-58.
55. Krieg PA. (Ed.). A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis. Wiley Liss; New York 1996.
56. Krumdieck CL, dos Santos JE, Ho KJ. A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. Anal Biochem 1980 May 1; 104(1): 118-23.
57. Kues U, Stahl U. Replication of plasmids in gram-negative bacteria. Microbiol Rev 1989 Dec; 53(4): 491-516.
58. Lake BG, Beamand JA, Japenga AC, Renwick A, Davies S, Price RJ. Induction of cytochrome P-450-dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. Food Chem Toxicol 1993 May; 31(5): 377-86.
59. Lion t, Control genes in reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays. Leukemia 1996, 10: 1527-28.
60. Lupp A, Danz M, Müller D. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. Toxicology. 2001 Mar 21;161(1-2):53-66.

61. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (eds.). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor 1989.
62. Martin R. (Ed.). Elektrophorese von Nukleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg 1996.
63. Mason HS. Mechanism of oxygen metabolism. *Advances in Enzymology* 1957; 19: 79-234.
64. Mathis JM, Houser WH, Bresnick E, Cidlowski JA, Hines RN, Prough RA, Simpson ER. Glucocorticoid regulation of the rat cytochrome P450c (P450IA1) gene: receptor binding within intron I. *Arch Biochem Biophys* 1989 Feb 15; 269(1): 93-105.
65. McMahon TF, Peggins JO, Centra MM, Weiner M. Age-related changes in biotransformation of azoxymethane and methylazoxymethanol in vitro. *Xenobiotica* 1990 May; 20(5): 501-13.
66. Meyer UA, Zanger UM, Skoda RC, Grant D, Blum M. Genetic polymorphisms of drug metabolism. *Prog Liver Dis.* 1990; 9: 307-23.
67. Micklos DA, Freyer GA. DNA Science: A First Course in Recombinant DNA Technology. Cold Spring Harbor Laboratory Press and Carolina Biological Supply Company; Cold Spring Harbor 1990.
68. Miller MG, Beyer J, Hall GL, deGraffenried LA, Adams PE. Predictive value of liver slices for metabolism and toxicity in vivo: use of acetaminophen as a model hepatotoxicant. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993 Sep; 122(1): 108-16.
69. Mulder GJ. (Ed.). Conjugation Reactions in Drug Metabolism. Taylor and Francis; London 1990.
70. Müller D, Glöckner R, Rost M, Steinmetzer P. Monooxygenation, cytochrome P450-mRNA expression and other functions in precision-cut rat liver slices. *Exp Toxicol Pathol* 1998 Sep; 50(4-6): 507-13.
71. Müller D, Glöckner R, Rost M. Monooxygenation, cytochrome P4501A1 and P4501A1-mRNA in rat liver slices exposed to beta-naphthoflavone and dexamethasone in vitro. *Exp Toxicol Pathol* 1996 Jul; 48(5): 433-8.

72. Müller D, Pissowotzki, Steinmetzer P, Glöckner R. Induction of cytochrom p450 2B1-mRNA and pentoxyresorufin O-depentylation after exposure of precision-cut rat liver sclices to phenobarbital. *Toxicology* 2000; 144: 93-97.
73. Nebert DW. Regulation of the mouse dioxin-inducible P450 gene. in: *Cytochrome P450*. Schuster I. (Ed.). Taylor & Francis; London 1990.
74. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1993 Jan-Feb; 12(1): 1-51.
75. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996 Feb; 6(1): 1-42.
76. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 1999 Sep 1; 369(1): 1-10.
77. Newton CR, Graham A. (eds.). *PCR*. 2. edition. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, 1997.
78. Nicholl DST (ed.), *Gentechnische Methoden*, Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, 1995.
79. Nishibe Y, Hirata M. Effect of phenobarbital and other model inducers on cytochrome P450 isoenzymes in primary culture of dog hepatocytes. *Xenobiotica* 1993 Jun; 23(6): 681-92.
80. Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 1990; 45(2): 241-98.
81. Olinga P, Groen K, Hof IH, De Kanter R, Koster HJ, Leeman WR, Rutten AA, Van Twillert K, Groothuis GM. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997 oct; 38(2): 59-69.



82. Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y. (Eds.). Cytochrome P-450 (2nd edition). Kodansha; Tokyo 1993.
83. Padgham CR, Boyle CC, Wang XJ, Raleigh SM, Wright MC, Paine AJ. Alteration of transcription factor mRNAs during the isolation and culture of rat hepatocytes suggests the activation of a proliferative mode underlies their de-differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993 Dec 15; 197(2): 599-605.
84. Padgham CR, Paine AJ, Phillips IR, Shephard EA. Maintenance of total cytochrome P-450 content in rat hepatocyte culture and the abundance of CYP1A2 and CYP2B1/2 mRNAs. *Biochem J* 1992 Aug 1; 285 ( Pt 3): 929-32.
85. Padmanaban G, Nirodi CS. Regulation of PB- inducible cytochrome P450 gene expression. *Frontiers in Biotransformation*. 1994; 9: 60-84.
86. Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 1995; 57(21): 1887-901.
87. Perbal BA. (ed.). Practical Guide to Molecular Cloning. John Wiley & Sons; New York 1988.
88. Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 1988 Sep 25; 263(27): 13802-5.
89. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society for Microbiology; Washington D. C. 1993.
90. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*. 1991 Jul 25; 266(21): 13469-72.
91. Potenza CL, Pendurthi UR, Strom DK, Tukey RH, Griffin KJ, Schwab GE, Johnson EF. Regulation of the rabbit cytochrome P-450 3c gene. Age-dependent expression and transcriptional activation by rifampicin. *J Biol Chem* 1989 Sep 5; 264(27): 16222-8.

92. Rickwood D, Rames BD. (eds.). Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach. IRL Press; Oxford 1990.
93. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber- Rolfs I.(eds.). PCR: Clinical Diagnostics and Research. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg 1992.
94. Ruegg CE. Preparation of precision-cut renal slices and renal proximal tubular fragments for evaluating segment-specific nephrotoxicity. J Pharmacol Toxicol Methods 1994 Jun; 31(3): 125-33.
95. Saad B, Scholl FA, Thomas H, Schawalder H, Streit V, Waechter F, Maier P. Crude liver membrane fractions and extracellular matrix components as substrata regulate differentially the preservation and inducibility of cytochrome P-450 isoenzymes in cultured rat hepatocytes. Eur J Biochem 1993 Apr 15; 213(2): 805-14.
96. Saatcioglu F, Perry DJ, Pasco DS, Fagan JB. Aryl hydrocarbon (Ah) receptor DNA-binding activity. Sequence specificity and Zn<sup>2+</sup> requirement. J Biol Chem 1990 Jun 5; 265(16): 9251-8 .
97. Saatcioglu F, Perry DJ, Pasco DS, Fagan JB. Multiple DNA-binding factors interact with overlapping specificities at the aryl hydrocarbon response element of the cytochrome P450IA1 gene. Mol Cell Biol 1990 Dec; 10(12): 6408-16.
98. Salyers KL, Barr J, Sipes IG. In vitro metabolism of theophylline by rat and human liver tissue. Xenobiotica 1994 May; 24(5): 389-99.
99. Scheunert A, Trautmann A. Lehrbuch der Veterinärmedizin (7.Auflage). Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg 1987: 530-532.
100. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. Nature 1992 Oct 8; 359(6395): 557-8.
101. Testa, B. Mechanisms of inhibition of xenobiotic-metabolizing enzymes. Xenobiotica. 1990 Nov; 20(11): 1129-37.
102. Thomas PE, Reik LM, Ryan DE, Levin W. Regulation of three forms of cytochrome P-450 and epoxide hydrolase in rat liver microsomes. Effects of age, sex, and induction. J Biol Chem 1981 Jan 25; 256(2): 1044-52.

103. Waxman DJ, Azaroff L. Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 1992 Feb 1; 281 ( Pt 3): 577-92.
104. Waxman DJ, Dannan GA, Guengerich FP. Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* 1985 Jul 30; 24(16): 4409-17.
105. Wen LP, Koeiman N, Whitlock JP Jr. Dioxin-inducible, Ah receptor-dependent transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Nov; 87(21): 8545-9.
106. Whitlock JP Jr. The regulation of cytochrome P-450 gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26: 333-69.
107. Yabusaki Y, Shimizu M, Murakami H, Nakamura K, Oeda K, Ohkawa H. Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for 3-methylcholanthrene-induced rat liver cytochrome P-450MC. *Nucleic Acids Res* 1984 Mar 26; 12(6): 2929-38.
108. Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends Pharmacol Sci.* 1990 Aug; 11(8): 321-4.

## **8. ANHANG**

### **Danksagung**

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Müller für die Bereitstellung des Themas, die ständige Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Versuche sowie bei der Abfassung der Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Rost für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Desweiteren möchte ich

Herrn Dr. Steinmetzer für zahlreiche und hilfreiche Tips bei der Arbeit und Frau Guder für die praktische Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung danken.

Jena, 2002

(Andreas Lößner)

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich Herr Prof. Dr. D. Müller, Direktor des Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena sowie der wissenschaftliche Mitarbeiter Dr. Rost unterstützt.

Eine Hilfe eines Promotionsberaters wurde durch mich nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Prüfungsarbeit habe ich weder für eine staatliche noch für andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich erkläre hiermit, die Arbeit bzw. eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Jena, 2002

(Andreas Lößner)

**Lebenslauf**

<i>NAME, VORNAME:</i>	Lößner, Andreas
<i>GEBURTSDATUM:</i>	25.11.1973
<i>GEBURTSORT:</i>	Magdeburg
<i>FAMILIENSTAND:</i>	verheiratet
<i>AUSBILDUNG:</i>	
1980 bis 1982	POS "Fjodor Artjom"
1982 bis 1990	POS "Juri Gagarin"
1990 bis 1992	Humboldt-EOS in Magdeburg
1992 bis 1999	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1999-2000	Arzt im Praktikum an der Otto v. Guericke Universität Magdeburg (Institut für Klinische Pharmakologie)
seit 05/2000	Arzt an der Klinik für Innere Medizin der Pfeifferschen Stiftungen Magdeburg
03/2001	Erteilung der Approbation
Jena, 2002	

(Andreas Lößner)